



Implications des gènes immuns et des cellules immunes dans le glioblastome

Elodie Vauleon

► To cite this version:

Elodie Vauleon. Implications des gènes immuns et des cellules immunes dans le glioblastome. Médecine humaine et pathologie. Université de Rennes, 2013. Français. NNT : 2013REN1B005 . tel-00927689

HAL Id: tel-00927689

<https://theses.hal.science/tel-00927689>

Submitted on 13 Jan 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne

pour le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : Biologie Sciences de la Santé

Ecole doctorale Vie-Agro-Santé

présentée par

ELODIE VAULEON

Préparée à l'UMR CNRS 6290
Institut de Génétique et Développement de Rennes
Composante Universitaire SVE

**Implications des
gènes immuns et des
cellules immunes
dans le glioblastome.**

**Thèse soutenue à Rennes
le 25 juin 2013**

devant le jury composé de :

Antoine CARPENTIER
PU-PH Hôpital AVICENNE / *rapporteur*

Pierre VERRELLE
PU-PH Centre JEAN PERRIN / *rapporteur*

Philippe MENEI
PU-PH CHU ANGERS / *examineur*

Yvon GUEGAN
PU-PH CHU RENNES / *examineur,*
président du jury

Jean MOSSER
PU-PH CHU RENNES / *directeur de thèse*

Véronique QUILLIEN
PH Centre Eugène Marquis / *co-directrice de thèse*

REMERCIEMENTS

A Monsieur le professeur Antoine Carpentier, Vous me faites l'honneur d'avoir accepté d'être un des rapporteurs de ma thèse. J'ai eu la chance de vous côtoyer lors de mon stage de master 2 à la Pitié-Salpêtrière. A cette occasion, j'ai pu apprécier votre gentillesse et votre disponibilité malgré votre emploi du temps chargé entre la clinique et la recherche. Soyez assuré ici de ma gratitude et de mon profond respect.

A Monsieur le professeur Pierre Verrelle, Vous me faites l'honneur d'avoir accepté d'être un des rapporteurs de ma thèse. Lors d'une rencontre dans un congrès de neuro-oncologie à Bucarest, j'ai pu profiter de vos conseils et j'ai apprécié votre gentillesse. J'espère que cette thèse aura su susciter votre intérêt. Soyez assuré de toute ma gratitude et de mon profond respect.

A Monsieur le professeur Philippe Menei, Vous avez accepté d'être membre de mon jury, Vous me faites le plaisir de juger ce travail, j'ai pu apprécier vos connaissances en neuro-oncologie lors de nos diverses rencontres hospitalo-universitaires. Soyez assuré de ma gratitude et de mon profond respect.

A Monsieur le professeur Yvon Guégan, Vous me faites l'honneur de juger mon travail en étant un membre de mon jury. Vous m'avez permis pendant mon premier stage d'externat de découvrir le monde chirurgical et hospitalier et Vous m'avez enseigné les bases cliniques de la neurochirurgie. Recevez aujourd'hui le témoignage de ma reconnaissance, de mon admiration et de mon profond respect.

A Monsieur le professeur Jean Mosser, Vous m'avez accueillie dans votre équipe UMR 6092 et Vous avez accepté d'être mon directeur de thèse. Vous avez su me guider et j'ai pu apprécier au cours de ces moments votre rigueur scientifique. Soyez assuré de ma reconnaissance et de mon profond respect.

A Madame la docteur Véronique Quillien, Vous avez accepté d'être ma co-directrice de thèse et de m'encadrer tout au long de mon travail de thèse. Merci de votre indulgence et de votre disponibilité. Soyez assurée de ma reconnaissance et de mon profond respect.

A Tony Avril, merci pour ta disponibilité indéfectible, ta gentillesse à travers ton soutien et ton aide précieuse tout au long de mon travail de thèse, même dans les moments de doutes. Merci également pour ton aide indispensable pour dessiner les « boîtes »...

A Marc Aubry, merci pour ta disponibilité, ton aide précieuse et ta pédagogie pour rendre accessible ce domaine vaste et obscure au premier abord qu'est la bioinformatique. Tu l'as simplifiée pour me permettre de comprendre, d'appréhender ces données d'analyses transcriptomiques, pour pouvoir les critiquer.

A Michèle Marty, merci pour tes explications techniques et ton aide dans les manip.

A Abderrahmane Hamlat, pour ton aide dans le recueil des échantillons tumoraux et ton soutien.

A Catherine Le Roux, mon ancienne co-chef, qui a fait son possible pour me permettre de me libérer du temps lors de nos 3 années de clinicat en commun, pour me rendre au laboratoire.

A Habiba Mesbah, merci pour ton aide précieuse, ton soutien et tes conseils avisés de statisticienne.

A Odile Audrain, merci de ta disponibilité et ton aide précieuse dans mes recherches bibliographiques.

A Monsieur le professeur Jean-Luc Raoul, qui m'a incité à m'inscrire en thèse de sciences dans l'équipe de Jean Mosser, devant mon plaisir à enseigner en tant que chef de clinique d'oncologie médicale et connaissant ma passion pour la neuro-oncologie. Ce travail m'a permis de renforcer les liens entre la neuro-oncologie clinique et la recherche plus fondamentale, qui se pérenniseront j'espère au-delà de ce travail de thèse. Soyez assuré de ma gratitude et de mon profond respect.

Merci à Bettina, ma colocataire de bureau, qui m'a soutenu notamment lors de la période difficile des différentes relectures et corrections.

A l'ensemble de l'équipe du laboratoire UMR et du Centre Eugène Marquis, merci de votre aide et de votre soutien quotidien.

Enfin et surtout, je tiens à remercier ma famille, tout particulièrement ma maman pour son amour inconditionnel qui m'a soutenu au cours de ces longues années et pour son aide indéfectible y compris dans tous les moments de découragements.

Merci aussi à Florian, Catherine et Marie Apolline pour tout ce bonheur que vous m'apportez qui m'encourage dans ma vie quotidienne.

Merci à Evelyne, « ma sœur » pour ta joie de vivre.

TABLES DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	i
---------------------------	----------

TABLE DES MATIERES.....	v
--------------------------------	----------

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....	x
-------------------------------------------	----------

RESUME.....	xii
--------------------	------------

ABSTRACT.....	xiv
----------------------	------------

1. INTRODUCTION.....	1
-----------------------------	----------

1.1 Prise en charge diagnostique et thérapeutique du glioblastome.....	1
-------------------------------------------------------------------------------	----------

1.1.1. Epidémiologie et facteurs de risque.....	1
--------------------------------------------------------	----------

1.1.2. Diagnostic clinique, radiologique et histologique.....	5
----------------------------------------------------------------------	----------

1.1.2.1. Diagnostic clinique.....	5
------------------------------------------	----------

1.1.2.2. Diagnostic radiologique.....	7
----------------------------------------------	----------

1.1.2.3. Diagnostic anatomopathologique.....	12
-----------------------------------------------------	-----------

1.1.3. Traitements.....	14
--------------------------------	-----------

1.1.4. Pronostic.....	21
------------------------------	-----------

1.1.5. Traitement de la récurrence.....	22
------------------------------------------------	-----------

1.2. Gènes et GBM.....	26
1.2.1. Généralités sur les méthodes d'analyse des gènes.....	26
1.2.2. Principaux gènes impliqués dans le GBM.....	28
1.2.2.1. Description des gènes.....	28
1.2.2.2. Intérêt dans la prise en charge des patients.....	32
1.2.3. Gènes immuns.....	36
1.2.3.1. Généralités sur GBM et immunité.....	36
1.2.3.1.1. Preuve de la fonctionnalité du système immunitaire dans le GBM.....	37
1.2.3.1.2. L'immunothérapie : une thérapie envisageable pour le GBM ?.....	35
1.2.3.2. Gènes immuns.....	40
 1.3. Infiltration cellulaire du GBM.....	 57
1.3.1. Rappel sur les principales populations du système immunitaire.....	58
1.3.2. Cellules immunitaires décrites dans le GBM.....	62
1.3.2.1. Infiltration macrophagique et microgliale.....	62
1.3.2.2. Infiltration lymphocytaire.....	65
1.3.2.3. Infiltration NK.....	69
1.3.2.4. Infiltration de polynucléaires.....	70
1.3.3. Description des autres populations cellulaires ayant un rôle sur le développement de la réponse immunitaire.....	71
1.3.3.1 Cellules souches gliomateuses.....	71
1.3.3.2 Fibroblastes associés au cancer.....	73
1.3.3.3. Cellules endothéliales.....	73
1.3.4. Le GBM : un environnement très immunosuppresseur.....	74

1.4. Objectifs généraux de la thèse.....	76
-------------------------------------------------	-----------

2. GENES IMMUNS, SIGNATURE IMMUNE

GENIQUE, FONCTIONNELLE ET PRONOSTIQUE...	78
-------------------------------------------------	-----------

2.1. Objectifs.....	78
----------------------------	-----------

2.2. Matériels et méthodes.....	79
----------------------------------------	-----------

2.2.1. Gènes.....	79
--------------------------	-----------

2.2.2. Patients et jeux de données.....	79
------------------------------------------------	-----------

2.2.3. Méthodes.....	82
-----------------------------	-----------

2.2.3.1. Profils immuns différentiels entre cerveaux non tumoraux et GBM, et au sein des GBM.....	82
----------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------

2.2.3.2. Analyse des réseaux de co-expression.....	83
-----------------------------------------------------------	-----------

2.2.3.3. Annotations fonctionnelles et enrichissement des modules de gènes des réseaux de co-expression.....	84
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------

2.2.3.4. Trois méthodes d'analyse de survie.....	84
---------------------------------------------------------	-----------

2.2.3.5. Modèle de risque de gènes immuns.....	85
-------------------------------------------------------	-----------

2.2.3.6. Procédure de RT Q-PCR.....	86
--------------------------------------------	-----------

2.3. Résultats.....	87
----------------------------	-----------

2.3.1. Profils immunologiques entre cerveaux normaux et GBM et au sein des GBM.....	87
--------------------------------------------------------------------------------------------	-----------

2.3.2. Modules de co-expression des gènes immuns.....	90
--------------------------------------------------------------	-----------

2.3.3. Analyses de survie.....	93
---------------------------------------	-----------

2.3.4. Modèle mathématique de survie.....	99
--------------------------------------------------	-----------

2.2.5. Validation du modèle de risque à 6 gènes immuns.....	102
--------------------------------------------------------------------	------------

2.3.6. Modèle de risque à 6 gènes et statut du promoteur de <i>MGMT</i>.....	106
-------------------------------------------------------------------------------------	------------

2.3.7. Modèle de risque à 6 gènes et sous-types de GBM.....	112
--------------------------------------------------------------------	------------

2.4. Discussion.....	116
2.4.1. Expression des gènes immuns dans les GBM.....	116
2.4.2. Expression des gènes immuns associés à la survie globale des patients.....	118
 3. Etude des cellules immunes infiltrant les GBM.....	127
3.1. Objectifs.....	127
3.2. Matériel et méthodes.....	128
3.2.1. Echantillons tumoraux.....	128
3.2.2. Phénotypage des cellules infiltrant les tumeurs.....	129
3.2.2.1. Préparation des échantillons.....	129
3.2.2.2. Analyse par cytométrie en flux.....	131
3.3. Résultats.....	132
3.3.1. Effet de la congélation sur les populations leucocytaires infiltrant les tumeurs.....	132
3.3.2. Variation de la proportion de la population leucocytaire infiltrant les tumeurs cérébrales.....	134
3.3.2.1. Influence du grade sur la population leucocytaire infiltrant les tumeurs cérébrales.....	134
3.3.2.2. Absence de la population leucocytaire infiltrant les tumeurs cérébrales dans les zones péri-tumorales et les cortectomies non-tumorales.....	137
3.3.3. Phénotypage des sous-populations leucocytaires infiltrant les GBM.....	138
3.3.3.1. Phénotypage de la sous-population majoritaire CD45 ⁺ CD11b ⁺	138
3.3.3.2. Phénotypage de la sous-population CD45 ^{faible} CD11b ^{fort}	141
3.3.3.3. Phénotypage de la sous-population CD45 ^{fort} CD11b ^{faible}	143
3.3.4. Relation entre l'infiltration leucocytaire et les données cliniques des patients atteints de GBM.....	145

3.3.4.1. Influence de l'âge des patients sur la population leucocytaire infiltrant les GBM.....	145
3.3.4.2. Influence de la prise de corticoïdes en préopératoire sur la population leucocytaire infiltrant les GBM.....	146
3.3.4.3. Influence de l'infiltration leucocytaire sur la survie des patients atteints de GBM.....	147
3.4. Discussion.....	150
3.4.1. Microglie macrophage.....	151
3.4.2. Lymphocytes.....	154
3.4.3. Polynucléaires neutrophiles et éosinophiles.....	159
3.4.4. Corticothérapie et âge.....	161
 4. CONCLUSION.....	 163
 5. PERSPECTIVES.....	 166
 6. BIBLIOGRAPHIE.....	 168
 7. ANNEXES.....	 211
7.1. Liste de gènes immuns.....	211
7.2. Liste des abréviations par ordre alphabétique.....	225
7.3. Article N°1.....	229
7.4. Article N°2.....	235
7.5. Article N°3.....	248
7.6. Article N°4.....	266
7.7. Article N°5.....	269
7.8. Article N°6.....	281
7. 9. Autorisation de soutenance.....	294

LISTES DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : glioblastome de l'Atlas de l'ANOCEF (TM 50x).....	12
Figure 2 : glioblastome de l'Atlas de l'ANOCEF (HE 100x).....	13
Figure 3 : schéma de traitement standard selon protocole Stupp.....	15
Figure 4 : schéma de gliomagenèse d'après Ohgaki et al.....	31
Figure 5 : mode d'action de la MGMT.....	34
Figure 6 : "Hallmarks of cancer : the next generation".....	39
Figure 7 : schéma de la réponse immune antitumorale (innée et acquise).....	58
Figure 8 : molécules immunosuppressives exprimées par les GBM avec leur cibles moléculaires et leur actions sur les cellules immunes effectrices.....	74
Figure 9 : profil immunologique entre cerveaux normaux et GBM.....	89
Figure 10 : représentation des Z scores des 28 gènes significatifs par la méthode de Cox.....	97
Figure 11 : diagramme de Venn des 3 méthodes statistiques et des gènes du risque.....	98
Figure 12 : courbe de survie en fonction du risque sur le jeu d'entraînement publié par de Tayrac (n=115 GBM).....	100
Figure 13 : courbe de survie en fonction du risque sur le jeu de validation publié par Petalidis (n=39 GBM).....	101
Figure 14 : courbe de survie en fonction du risque sur le jeu publié par Lee (n=161 GBM).....	102
Figure 15 : courbe de survie en fonction du risque sur le jeu publié par Verhaak (n=173 GBM).....	103
Figure 16 : courbe de survie en fonction du risque sur la cohorte locale Agilent (n=41 GBM).....	104
Figure 17 : courbe de survie en fonction du risque sur la cohorte locale par RT-PCR (n=57 GBM).....	105
Figure 18 : courbe de survie en fonction du risque et du statut <i>MGMT</i> sur le jeu publié par Lee (n=161 GBM).....	107
Figure 19 : courbe de survie en fonction du risque et du statut <i>MGMT</i> sur la cohorte locale Agilent (n=41 GBM).....	108
Figure 20 : courbe de survie en fonction du risque et du statut <i>MGMT</i> sur la cohorte locale par RT-Q PCR (n=56 GBM).....	109
Figure 21 : courbe de survie en fonction du risque et du statut <i>MGMT</i> sur le jeu publié par Verhaak (n=164 GBM).....	110
Figure 22 : courbe de survie en fonction du risque si promoteur <i>MGMT</i> non méthylé sur le jeu publié par Verhaak (n=122 GBM).....	111
Figure 23 : courbe de survie en fonction du risque si GBM proneural versus non proneural sur le jeu publié par Lee (n=161 GBM).....	113
Figure 24 : courbe de survie en fonction du risque si GBM proneural versus non proneural sur le jeu publié par Verhaak (n=173 GBM).....	114
Figure 25 : courbe de survie en fonction du risque si GBM proneural versus non proneural sur la cohorte locale Agilent (n=41 GBM).....	115
Figure 26 : analyse des populations infiltrantes par cytométrie de flux.....	131
Figure 27 : comparaison du pourcentage de cellules leucocytaires dans les prélèvements de GBM fraîchement préparés et obtenus après décongélation.	132
Figure 28 : comparaison des sous-populations leucocytaires dans les prélèvements de GBM fraîchement préparés et obtenus après décongélation.	133
Figure 29 : présence de sous-populations leucocytaires dans les prélèvements de tumeurs cérébrales.	134

Figure 30 : présence de sous-populations leucocytaires dans les prélèvements de GBM.....	135
Figure 31 : présence de sous-populations leucocytaires dans les prélèvements de gliomes de grades II et III.....	136
Figure 32 : présence de sous-populations leucocytaires dans les zones tumorales et péri-tumorales de prélèvements issus de tumeurs cérébrales.....	137
Figure 33 : Phénotypage de la sous-population CD45+ CD11b+ infiltrant les GBM...140-141	
Figure 34 : phénotypage de la sous-population CD45 ^{faible} CD11b ^{fort} infiltrant les GBM....142	
Figure 35 : Phénotypage de la sous-population CD45 ^{fort} CD11b ^{faible} infiltrant les GBM...144	
Figure 36 : Influence de la prise de corticoïdes sur la population leucocytaire infiltrant les GBM.....	146
Figure 37 : courbe de survie en fonction de l'infiltration CD45+.....	148
Figure 38 : courbe de survie en fonction de l'infiltration lymphocytaire.....	149

Tableau 1 : groupes RPA modifiés des GBM.....	21
Tableau 2 : gènes immuns rapportés dans la littérature.....	41-46
Tableau 3 : caractéristiques des patients et des sets de données.....	81
Tableau 4 : modules de co-expression et annotations fonctionnelles.....	91
Tableau 5 : modules de co-expression et enrichissement en gènes pronostiques.....	92
Tableau 6 : analyse de Cox pas à pas.....	94
Tableau 7 : analyse du 1 ^{er} versus le 4 ^{ème} quartile.....	95
Tableau 8 : analyse des Z scores.....	96
Tableau 9: Liste des marqueurs utilisés pour le phénotypage des leucocytes infiltrant les tumeurs.....	130
Tableau 10 : récapitulatif de l'infiltration de cellules immunes dans 73 GBM.....	145

RESUME

IMPLICATIONS DES GENES IMMUNS ET DES CELLULES IMMUNES DANS LE GLIOBLASTOME.

Introduction : Le glioblastome (GBM) est la tumeur cérébrale primitive la plus fréquente et la plus grave de l'adulte. Des études épidémiologiques ont mis en évidence que les antécédents d'allergie sont un facteur protecteur, soulignant le possible impact de l'immunité sur le GBM. Plusieurs études transcriptomiques ont également mis en évidence des signatures immunes plus ou moins associées à la survie.

Matériel et méthodes : Pour clarifier ce lien et déterminer quels gènes immuns étaient les plus impliqués dans le GBM, nous avons étudié l'expression de 791 gènes immuns dans des échantillons de GBM et de cerveaux normaux. Les interactions entre les gènes immuns ont été étudiées par une analyse de co-expression. Nous avons ensuite recherché une association entre les gènes immuns et la survie selon 3 méthodes statistiques, avant d'établir un modèle de risque mathématique validé sur plusieurs jeux de données. Enfin, nous avons étudié les cellules immunes infiltrantes sur des échantillons de gliomes dont 73 GBM par cytométrie de flux.

Résultats : Un profil d'expression génique différent significativement entre le cerveau normal et le GBM a été établi de manière robuste, mais pas au sein des GBM. L'analyse de co-expression a mis en évidence 6 modules dont 5 sont enrichis en gènes ayant un lien avec la survie. Cent huit gènes immuns ont une association significative avec la survie et un prédicteur de risque à 6 gènes immuns a permis de distinguer deux groupes de patients en fonction de leur survie, y compris chez les patients dont la tumeur a un promoteur *MGMT* méthylé et dans le sous-groupe de GBM proneuraux. Enfin, nous avons mis en évidence, dans

tous les échantillons de GBM analysés, une infiltration leucocytaire par des cellules macrophagiques/microgliales et parfois par des cellules lymphocytaires ou granulocytaires. L'infiltration de lymphocytes uniquement est associée significativement avec la survie dans notre cohorte.

Conclusion : Des gènes, impliqués dans diverses fonctions immunes, sont différentiellement exprimés entre le cerveau normal et le GBM et au sein des GBM. Un prédicteur à 6 gènes robuste a été établi, il sépare les patients en 2 groupes bas et haut risque y compris ceux ayant un bon pronostic. Nous avons enfin mis en évidence dans une série de GBM une infiltration de cellules immunes, dont une infiltration lymphocytaire associée positivement à la survie.

ABSTRACT

IMPLICATIONS OF IMMUNE-ASSOCIATED GENES AND IMMUNE CELLS IN GLIOBLASTOMA.

Background: Glioblastoma is the most common and lethal primary brain tumor in adults. Epidemiological studies have revealed that a history of allergies is a protective factor, thereby underlining the likely impact of the immune system on GBM. A number of transcriptomic studies have also identified immune signatures more or less associated with patient survival.

Methods: In order to clarify and identify which immune-associated (IA) genes were the most involved in GBM, we studied the expression of 791 immune genes in GBM and normal brains samples. Interactions between IA genes were studied through an analysis of co-expression network. We then searched for a link between IA genes and patient survival according to 3 statistical methods, before defining a mathematical risk model based on different data sets. Finally, we studied the infiltrative immune population of 73 GBM by cytometry.

Results: A significantly different profile of IA genes expression between healthy brains and GBM was consistently defined, but not among GBM. The analysis of co-expression network revealed 6 modules, 5 of which were enriched by genes associated with patient survival. 108 IA genes have a significant association with patient survival and the 6-IA gene risk predictor allowed us to distinguish two groups of patients according to their survival, including patients whose tumor had a methylated MGMT gene promoter and in the subset of proneural GBM. Finally, in every analyzed GBM sample, we have shown that there was a leukocyte infiltration by macrophages/microglial cells and sometimes by lymphocytes or granulocytes.

Only the lymphocytes infiltration was significantly associated with the survival in our group of patients.

Conclusion: IA genes that are involved in various immune functions are expressed differentially between healthy brains and GBM and amongst GBM. A robust 6-IA gene risk predictor was defined: it divides patients into two low and high risk groups, including those who have a good prognosis. Finally, we revealed an infiltration of immune cells in a series of GBM, only the lymphocytic infiltration was positively associated with patient survival.

1. INTRODUCTION

1.1 Prise en charge diagnostique et thérapeutique du GBM

1.1.1. Epidémiologie et facteurs de risque

Le glioblastome multiforme (GBM) représente la tumeur cérébrale primitive la plus fréquente correspondant à 60-75 % des gliomes de haut grade (1-3). En France, l'incidence du GBM est d'environ 3 cas pour 100000 habitants (4), un peu moins de 3000 nouveaux cas sont ainsi enregistrés par an (5-7). Le pic de fréquence du GBM est d'environ 64 ans, mais le diagnostic peut être posé à tout âge. D'après le registre français, l'incidence du GBM augmente d'1% chaque année, elle est quasi-nulle chez l'enfant et augmente de manière linéaire jusqu'à 75 ans avant de décroître (7;8). Cette augmentation peut être liée au vieillissement de la population mais aussi aux progrès de l'imagerie et des moyens diagnostiques. Leur accès est facilité depuis quelques années permettant l'obtention d'un diagnostic histologique et donc un enregistrement croissant du nombre de tumeurs cérébrales (6). Le sexe ratio est de 1,6 avec une prédominance masculine (9).

Le GBM représente la tumeur cérébrale primitive la plus grave de l'adulte : le décès du patient survient dans les 3 mois environ après le diagnostic sans traitement; la résection chirurgicale allonge la survie des patients de 6 mois et la radiothérapie adjuvante de 9 mois (10). Les GBM peuvent correspondre à une évolution péjorative d'une tumeur de plus bas grade, ils sont dits secondaires contrairement aux GBM de *novo*. Ces GBM secondaires, représentant 10 % de l'ensemble des GBM, surviennent chez des sujets plus jeunes, avec une histoire naturelle plus longue et un meilleur pronostic (11).

Les tumeurs cérébrales, en général, ont probablement une origine multifactorielle avec quelques facteurs de risque établis et d'autres suspectés et/ou en cours d'études épidémiologiques. Rarement, dans moins de 5% des cas, il est retrouvé des formes familiales de gliomes notamment dans le cadre de syndromes génétiques prédisposant (12;13) : le syndrome de Li Fraumeni, le syndrome de Lynch avec des manifestations cérébrales (anciennement appelé syndrome de Turcot), la sclérose tubéreuse de Bourneville et la neurofibromatose de type I et II.

L'antécédent de radiothérapie cérébrale, est un facteur de risque reconnu de tumeurs cérébrales (1), que ce soit une radiothérapie thérapeutique pour les tumeurs (14-16) ou en prophylaxie cérébrale pour une leucémie lymphoblastique (17-19). D'autres facteurs sont encore en cours d'études épidémiologiques avec une forte suspicion d'imputabilité comme l'exposition aux dérivés nitrés (20) et aux pesticides (21-23). D'autres études sont encore controversées notamment sur l'impact des champs magnétiques à basse fréquence (24-26) et de la téléphonie (27-31).

A l'inverse certaines études ont mis en évidence des facteurs protecteurs des gliomes comme les hormones féminines (32) et certaines infections virales. En effet, une étude rapporte qu'une primo-infection au cytomégalo virus (CMV) dans la petite enfance pourrait être associée à un risque plus faible de GBM contrairement à une infection plus tardive dans l'enfance ou à l'âge adulte (33). Cependant une autre étude épidémiologique américaine n'observe pas d'association entre l'incidence du GBM et la prévalence de l'infection à CMV d'après les données de surveillance de l'organisme SEER (surveillance epidemiology and end results). En effet, la prévalence du CMV est plus faible chez l'homme caucasien alors que l'incidence du GBM est plus élevée que chez la femme et les hommes noirs et hispaniques (34). Cobbs et *al.* ont été les premiers à mettre en évidence l'antigène du CMV dans le GBM

(35). L'expression des protéines virales du CMV (IE1, pp65, et les antigènes tardifs) par immunohistochimie (IHC) a été retrouvée dans tous les 27 échantillons de gliomes malins, et dans aucun tissu cérébral normal ou dans des échantillons d'autres pathologies cérébrales. Les acides nucléiques du CMV ont été détectés dans la tumeur par hybridation *in situ* et par réaction de polymérisation en chaîne (polymerase chain reaction en anglais PCR) nichée. L'ADN viral du CMV a été détecté dans le sang de 80% de patients pris en charge pour un GBM, contrairement à une cohorte de 17 témoins dont 11 ayant un antécédent de CMV (36). Plus de 90% des GBM présentent dans cette étude une positivité des antigènes viraux pp65 et IE1 en IHC. Dans une autre étude, les 11 patients ayant un GBM positif pour le CMV en IHC présentent tous dans le sang des lymphocytes T spécifiques ciblant les antigènes pp65 et IE1 (37). Après la première injection d'un vaccin à base de cellules dendritiques pulsées avec un lysat tumoral autologue, il a été observé une augmentation significative de lymphocytes dirigés contre pp65, suggérant la présence de cette protéine dans le lysat tumoral (38). Certains auteurs suggèrent que le CMV exprimé par les GBM pourrait constituer une cible thérapeutique (39;40). Deux autres études ont rapporté une bonne tolérance de l'ajout de valganciclovir, un traitement anti-CMV, au traitement standard d'un GBM. Cette étude rétrospective indique qu'un tel traitement pourrait allonger la survie des patients (41;42). Cependant une autre étude ne retrouve pas de CMV dans le sang, par analyse PCR après transcription inverse d'un acide ribonucléique (ARN) en acide désoxyribonucléique (ADN) complémentaire (RT-PCR pour reverse transcriptase PCR en anglais) chez 5 patients ayant un GBM et lors de l'analyse de cultures de sang périphérique (43). Des études complémentaires sont donc nécessaires pour évaluer l'impact du CMV dans l'incidence du GBM et dans la possibilité d'une nouvelle arme thérapeutique. D'autres infections virales ont également été étudiées : polyomavirus simian virus SV40, JC virus (JCV) dont l'incidence est plus élevée

chez patients atteints d'une tumeur cérébrale (44-46) et le virus de la varicelle et du zona dont l'incidence est plus faible (47).

Enfin, il a été mis en évidence dans des études épidémiologiques une corrélation inverse entre les antécédents d'allergie et l'incidence des gliomes, ceci étant confirmé par la méta-analyse de Linos (48-54). En effet, l'asthme, l'eczéma et toutes autres formes d'allergie sont associés à un risque plus faible de gliome avec un risque relatif entre 0,5 et 0,7 avec un intervalle de confiance statistiquement significatif dans ces différentes études. L'association inverse entre les antécédents d'allergie et l'incidence des gliomes semblerait renforcée par la présence du polymorphisme en 9p21.3 codant pour le gène cycline dépendante kinase inhibiteur 2B et 2A (49). Cette région est notamment délétée dans certaines néoplasies dont les tumeurs cérébrales (55;56). Les réactions immunes excessives dues au phénomène allergique via les cellules B, T et les cytokines, pourraient interférer avec la croissance cellulaire tumorale (48;51). De plus, les patients traités pour un gliome auraient une survie plus longue si le taux d'immunoglobuline E (IgE) sanguine, témoin d'une réaction allergique, est élevé (57). Une autre étude a montré que le taux sérique de cluster de différenciation 14 (CD14) est plus élevé et le taux de CD23 plus bas chez des patients ayant un gliome comparé à des témoins (54). Ces taux ne sont pas modifiés par la chirurgie, ni par la radiothérapie ni par le témozolomide, ni par les corticoïdes. Le CD14 inhibe la prolifération de cellules T et le développement des cellules B (58). Le CD23 induit entre autres la synthèse d'IgE, la différenciation de cellules B et T (59). Cette étude est un autre témoin de l'interférence du système immunitaire et notamment de la réponse innée et adaptative humorale dans la gliomagenèse.

Ces différentes données sur les liens entre les infections virales, les allergies et les gliomes confortent l'idée d'une implication du système immunitaire dans la gliomagenèse et dans la croissance tumorale.

1.1.2. Diagnostic clinique, radiologique et histologique

1.1.2.1. Diagnostic clinique

Les circonstances de découverte d'une tumeur cérébrale sont multiples et variées, elles dépendent entre autres de sa localisation, de son type, de sa rapidité de croissance tumorale, des complications possibles, et du patient avec notamment l'importance de l'hémisphère dominant du patient (gaucher ou droitier) pour expliquer la symptomatologie clinique. Le GBM, comme les autres gliomes de haut grade, a une histoire de la maladie récente et parfois brutale.

Les signes cliniques peuvent être aspécifiques (céphalées, trouble cognitif, crise convulsive d'emblée généralisée) ou évocateurs de complications (hypertension intracrânienne (HTIC), compression des voies d'écoulement du liquide céphalo-rachidien (LCR), engagement, hémorragie). Cependant des signes de focalisation (crise partielle, signes déficitaires) peuvent orienter vers la localisation tumorale.

La sémiologie de l'HTIC associe des céphalées en casque surtout matinales, des nausées et des vomissements en jet, des troubles visuels (œdème papillaire, diplopie horizontale par paralysie du VIème nerf crânien : nerf abducens ou moteur oculaire externe), des troubles de vigilance et/ou des troubles des fonctions supérieures. L'hydrocéphalie aigüe peut être un signe lié à la compression brutale des voies d'écoulement du LCR par les tumeurs à croissance rapide comme le GBM. Cliniquement, des troubles de la marche sont associés à des troubles urinaires et cognitifs. De plus, le cerveau est compartimenté avec des structures rigides, comme la tente du cervelet et la faux du cerveau, et des structures fluides, comme le parenchyme cérébral. Sous l'effet de la compression de la tumeur, le parenchyme est « poussé » dans toutes les directions induisant un engagement ou une hernie du cerveau à travers des orifices.

La sémiologie déficitaire est dépendante de l'hémisphère dominant et du siège de la tumeur. Une lésion frontale postérieure induira une hémiparésie contralatérale, une lésion frontale antérieure créera un syndrome frontal qui peut associer une indifférence ou moria, à des troubles de l'attention, des troubles mnésiques, un phénomène de persévération et un grasping. Une lésion non seulement frontale mais fronto-calleuse entraînera une confusion, des troubles d'équilibre, et des troubles mnésiques antérogrades. Une lésion temporale gauche sera évoquée devant une aphasie de Wernicke associée à une paraphasie et/ou une hémianopsie latérale homonyme (HLH). Une lésion temporale droite sera mise en évidence souvent devant un tableau d'HTIC. Une lésion pariétale peut être mise en évidence devant une astérognosie, une apraxie, des troubles du schéma corporel et/ou une HLH. Une lésion occipitale peut être diagnostiquée devant une HLH. Une lésion des noyaux gris centraux est à évoquer devant une hémiparésie par envahissement de la capsule interne et/ou un hémisindrome sensitif. Une lésion de la fosse postérieure latéralisée, des hémisphères cérébelleux, engendrera des signes cérébelleux cinétiques et une lésion médiane du vermis des signes cérébelleux statiques plus ou moins associés à une atteinte des paires crâniennes. Une lésion de l'angle ponto-cérébelleux sera diagnostiquée devant des troubles auditifs, des troubles d'équilibre, une paralysie faciale et/ou une névralgie du trijumeau.

L'épilepsie est inaugurale dans 30 % des cas de tumeur cérébrale avec des crises partielles ou généralisées. Elles peuvent être localisatrices grâce à leur variabilité clinique. Une lésion frontale engendrera une crise frontale paroxystique. Une lésion temporale dans l'hémisphère dominant amènera des troubles paroxystiques du langage voire une crise olfactive, psychomotrice ou auditive. Une lésion pariétale sera diagnostiquée devant une crise sensitive paroxystique paresthésique. Une lésion occipitale sera évoquée devant des hallucinations visuelles élémentaires.

Les métastases extranévratiques par voie hématogène sont rarissimes du fait de la barrière hémato-encéphalique (BHE) mise en évidence au XIXème siècle suite à la faible diffusion intracérébrale des substances injectées dans le sang et inversement ; la propagation tumorale est donc restreinte au niveau du parenchyme, des méninges et du LCR.

1.1.2.2. Diagnostic radiologique

Devant des troubles neurologiques, l'examen clinique est complété par un scanner cérébral sans injection pour confirmer le diagnostic de processus occupant l'espace. Une imagerie par résonnance magnétique (IRM) injectée avec du produit de contraste (Gadolinium) permet de caractériser la tumeur (localisation, prise de contraste, nécrose), mais aussi les conséquences (œdème périlésionnel, hémorragie, effet de masse sur la ligne médiane, sur les ventricules et/ou engagements).

Majoritairement, le GBM se présente radiologiquement par une lésion hétérogène en hyposignal T1 et en hypersignal T2, avec une prise de contraste irrégulière hétérogène, correspondant à la partie infiltrante hypercellulaire de la tumeur, avec une zone de nécrose centrale, associées à un hypersignal Flair périphérique correspondant en partie à l'œdème périlésionnel plus ou moins associé aux cellules infiltrantes isolées autour de la lésion tumorale. Comme la lésion est expansive rapidement dans la voute crânienne inextensible, un effet de masse voire un engagement sont souvent retrouvés. Parfois, le GBM est multifocal, avec plusieurs lésions cérébrales ayant sensiblement les mêmes caractéristiques radiologiques. Cependant, 5 à 15 % des GBM n'ont aucun réhaussement après l'injection de gadolinium (ce qui est considéré comme le témoin d'une tumeur de haut grade) alors que 20 % des gliomes de bas grade ont une prise de contraste après l'injection de gadolinium (60). Un hypersignal est parfois visible avant l'injection de gadolinium en cas de saignement spontané.

Cette imagerie peut être complétée par une imagerie fonctionnelle multimodale avec des séquences de perfusion, de diffusion et/ou de spectroscopie, pour confirmer les différentes caractéristiques du GBM (tumeur hypervascularisée avec des signes de néoangiogenèse sur les séquences de perfusion, avec une hyperdensité cellulaire périphérique et hyperactive métaboliquement) et éliminer les diagnostics différentiels des tumeurs cérébrales. L'imagerie évocatrice de gliomes de haut grade est parfois trompeuse. En effet, des images en cocarde prenant le contraste en périphérie peuvent également correspondre à un abcès atypique. Cet abcès a un centre rempli de pus, visqueux, limitant la diffusion de l'eau libre. Le coefficient de diffusion apparent (ADC pour apparent diffusion coefficient en anglais) est bas au centre d'un abcès, contrairement à la nécrose tumorale des gliomes malins (61). La nécrose est peu cellulaire dans les gliomes de haut grade donc l'eau peut diffuser librement et l'ADC est élevé, alors qu'il est bas au niveau de la zone hypercellulaire en périphérie.

La spectro-IRM a permis également d'éliminer certains diagnostics différentiels et de mieux comprendre le métabolisme cérébral. La choline reflète le turn-over membranaire, la créatine correspond à l'énergie cellulaire, le N-acétyl-L-aspartate (NAA) représente l'activité des neurones. Les lactates apparaissent en cas de métabolisme anaérobie donc d'ischémie, les lipides sont les témoins d'une rupture cellulaire donc de la présence de nécrose. En spectroscopie IRM, les tumeurs de haut grade ont des pics de NAA diminués, un rapport choline sur créatine supérieur à 2, un rapport choline sur NAA supérieur à 2 et une apparition de pics de lactates et lipides.

L'imagerie est nécessaire pour la prise en charge thérapeutique initiale, en cours de traitement et lors du suivi thérapeutique. L'IRM initiale de diagnostic devient en effet indispensable en cas de tumeur non résécable, pour cibler le trajet de biopsie stéréotaxique le plus optimal, en condition de neuro-navigation, pour obtenir un échantillonnage tumoral le plus significatif sans risque de séquelles. En effet le GBM est hétérogène, si une biopsie est retenue et non une

exérèse chirurgicale, il faudra que le neurochirurgien prélève la zone la plus représentative de la tumeur. Il faudra soit cibler la zone de haut grade, soit la zone la plus cellulaire ou la plus vascularisée sur l'IRM et non la nécrose qui n'est pas informative en anatomopathologie pour affirmer le diagnostic. Les progrès des appareils interactifs de neuro-navigation permettent maintenant de déterminer la position du scalpel du neurochirurgien en temps réel en le transposant virtuellement sur l'IRM pré-opératoire via un logiciel dédié. Le trajet le plus efficient et le moins risqué pour obtenir le diagnostic est donc ainsi défini en pré et en per-opératoire (62). L'IRM initiale pré-opératoire peut également aider à guider le neurochirurgien quand la lésion est proche des zones potentiellement à risque de séquelles (aire motrice, aire de la parole...) grâce aux séquences fonctionnelles. Elles déterminent quelles zones sont réellement utilisées chez le patient pour le langage, la motricité... etc... Elles permettent de fixer les limites de l'exérèse en pré-opératoire pour diminuer ou éviter les risques de séquelles en post-opératoire. Comme les gliomes de bas grade où la chirurgie éveillée est utilisée par certaines équipes, son intérêt peut se discuter dans la prise en charge du GBM. De même, la chirurgie peut être également facilitée surtout en zone fonctionnelle par la résection fluoroguidée par de l'acide 5 aminolevulinique (5 ALA), en cours d'étude dans un soutien aux techniques innovantes et coûteuses (STIC) conduit par Professeur Guyotat de Lyon. Cependant, le GBM n'est pas une tumeur limitée comme les gliomes de bas grade, il s'agit d'une tumeur infiltrante avec des cellules isolées parfois à distance de la tumeur initiale (63). Cette aide à une chirurgie « limitée » en zone fonctionnelle n'est donc pas toujours applicable raisonnablement en cas de GBM. En effet, le challenge du neurochirurgien vis-à-vis du GBM est d'obtenir une exérèse si possible totale ou la plus large possible sans risque de séquelle, pour privilégier la qualité de vie.

L'IRM post-opératoire devient obligatoire dans les 24 heures, voire dans les 48 heures pour évaluer la qualité de l'exérèse chirurgicale (complète, sub-totale ou partielle). En effet, une IRM plus tardive ne permettra pas de distinguer une prise de contraste d'origine tumorale ou cicatricielle (64). L'évaluation de la qualité d'exérèse mise en évidence par l'IRM post-opératoire est importante, des études ont non seulement mis en évidence un gain de survie en cas d'exérèse totale (65) mais la présence d'un reliquat tumoral doit aussi être prise en compte dans la définition des volumes d'irradiation.

Le traitement adjuvant, notamment la radiothérapie, a besoin de l'IRM initiale pour la fusion avec les images de centrage pour permettre de mieux définir les différents volumes d'irradiation, que nous décrivons dans le paragraphe du traitement. Un essai de phase III est actuellement ouvert en France, qui évalue l'intérêt de rajouter un boost au traitement standard. Le volume d'irradiation dit standard (PTV1), qui correspond à la prise de contraste avec une marge de 2 cm, recevra la dose de 60 Grays (Gy). Les zones actives selon la spectro-IRM (PTV2) correspondant aux zones où le ratio Cho/NAA est supérieur à 2 avec une marge de 0,7 mm et les zones de prise de contraste avec une marge de 3 mm recevront un boost de 2,4 Gy par jour pour une dose cumulative de 72 Gy (NCT01507506).

Une IRM est effectuée dans le mois qui suit la radio-chimiothérapie concomitante pour servir de référence pour l'évaluation de la réponse afin de ne pas confondre une progression et une pseudoprogression sur l'IRM ultérieure. Cette dernière correspond à une augmentation de taille de la lésion avant qu'une réponse partielle n'apparaisse, témoignant d'un bon pronostic (66). Enfin, le suivi par IRM permettra d'évaluer la réponse thérapeutique et de diagnostiquer les récurrences dans le suivi. Les critères de réponse actuellement retenus sont ceux de RANO (response assessment in neuro-oncology) plus que les critères de Mac Donald (67;68).

Ces critères associent des items cliniques (état neurologique, posologie de la corticothérapie) aux critères radiologiques (somme des diamètres perpendiculaires des lésions prenant le contraste; mesure du signal en T2/FLAIR sans lien avec une comorbidité : post-opératoire, post-irradiation, ou post-critique...). En effet, certaines comorbidités, comme un état de mal épileptique même infraclinique, peuvent modifier les images d'IRM sans impact sur l'évolution ou la survie. La difficulté de diagnostic entre une récurrence et une radionécrose liée aux effets des thérapeutiques est maintenant facilitée par la spectro-IRM. En effet le métabolisme tumoral est différent de celui de la nécrose, permettant de faire la distinction entre les deux cas. Cependant, il s'agit souvent d'un mélange de nécrose et de tumeur, qui est mis en évidence à l'IRM.

La tomographie par émission de positrons (TEP) est une technique de médecine nucléaire qui peut être également utilisée en neuro-oncologie. La plus utilisée, la TEP au fluor marqué au 18 fluorodésoxyglucose (18-FDG) avec acquisition des images à un temps tardif, permet de distinguer les tumeurs de bas ou haut grade et de distinguer la tumeur d'une toxicité de la radiothérapie (69). Un essai de phase II étudie la corrélation entre la TEP 18-FDG avant la chirurgie et le caractère anatomopathologique de malignité (notamment l'index KI 67 > 15 %) (étude GLIO-TEP, NCT00624728). D'autres substrats et traceurs sont encore en cours d'études : notamment la méthionine qui serait un témoin plus sensible du caractère tumoral (70), le 18 fluoro-éthyl-tyrosine (18-FET), qui est un traceur de malignité et le fluoromisonidazole qui est un traceur de l'hypoxie. Une étude française est en cours pour évaluer une escalade de dose de radiothérapie à 74 Gy au niveau des zones d'hypoxie connues pour être radiorésistantes. Ces zones sont déterminées par la fixation de la TEP au fluoromisonidazole (71) (NCT00906893). La TEP au 18-FET, marqueur de la malignité, a mis en évidence des zones hypermétaboliques correspondant à du haut grade (III et IV) confirmé histologiquement. Ces zones n'étaient pas visualisées par l'IRM, qui était en faveur

d'un gliome de bas grade (72). La TEP à la méthionine est utilisée dans un essai américain pour aider au diagnostic non invasif de tumeur cérébrale de l'enfant (NCT00840047), il n'est pas ouvert en France.

1.1.2.3. Diagnostic anatomopathologique

La clinique et l'imagerie peuvent faire suspecter un gliome mais le diagnostic formel d'un gliome est uniquement histopathologique. En effet, le diagnostic est actuellement posé selon la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) de 2007 (73), qui différencie les gliomes à partir de la différenciation cellulaire (astrocytome, oligodendrogliome, mixte oligoastrocytome), de la présence d'atypie nucléaire ou de mitose, de nécrose et de prolifération endothéliale. Selon cette classification, le GBM correspond aux astrocytomes de grade IV. Le diagnostic de GBM est ainsi posé devant la présence d'une tumeur présentant une densité cellulaire élevée, une prolifération endothéliocapillaire et des plages de nécrose avec des pseudo-palissades (Cf. Figure 1).

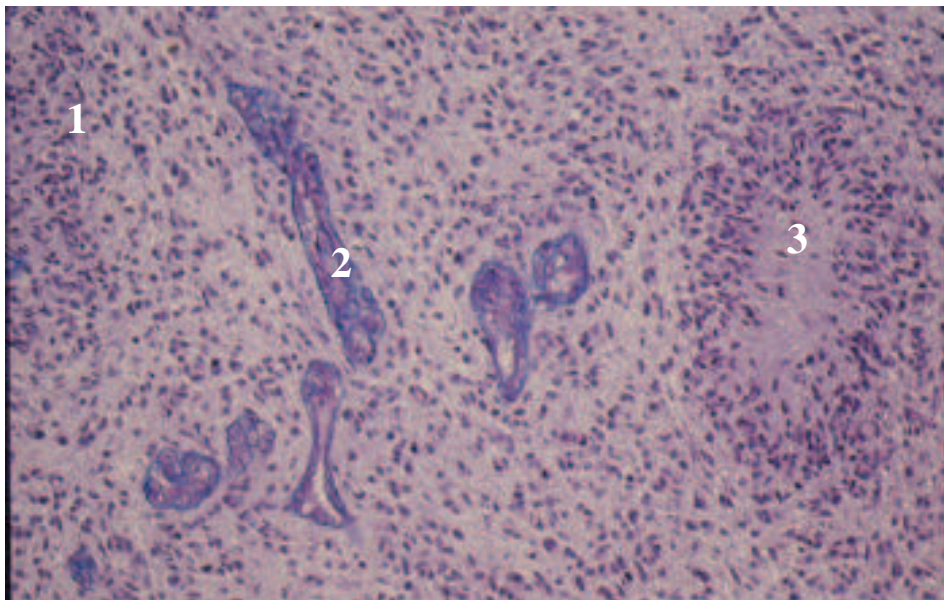


Figure 1 : glioblastome de l'Atlas de l'ANOCEF (TM 50x).

Coupe histologique typique d'un GBM : forte **densité cellulaire** (1), nombreuses **mitoses**, nombreux vaisseaux avec **prolifération endothéliale** (2) et **nécroses** focales avec arrangement palissadique (3).

Le GBM multiforme peut-être composé notamment de quelques cellules giganto-cellulaires avec des noyaux anisocaryotiques et de nombreux nucléoles. De nombreuses mitoses sont également retrouvées à fort grossissement (Cf. Figure 2).

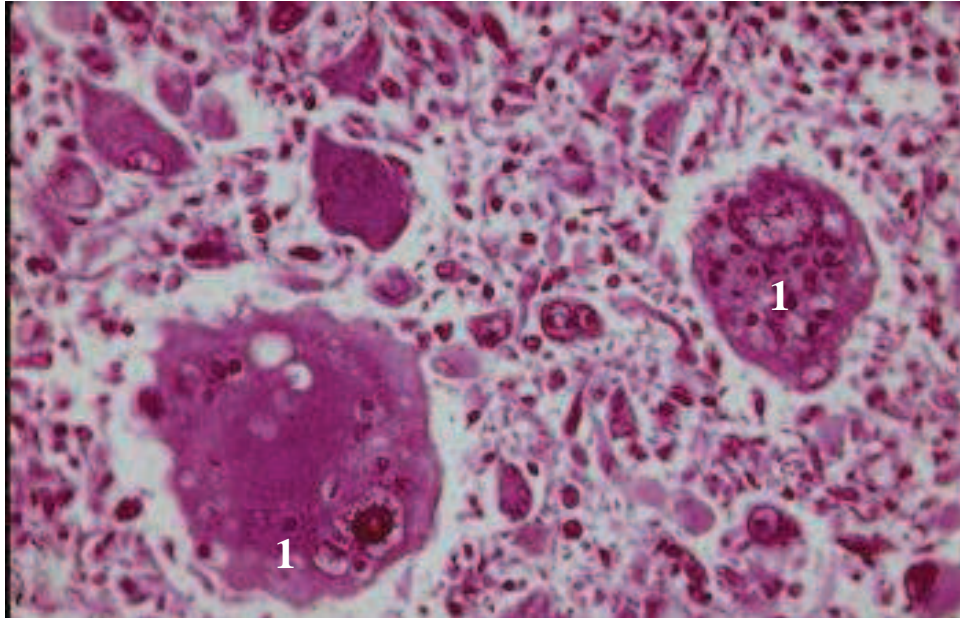


Figure 2 : glioblastome de l'Atlas de l'ANOCEF (HE 100x).

Coupe histologique de GBM giganto-cellulaire en gros plan avec **monstruosités cellulaires (1)** avec taille géante, noyaux multiples et polymorphes contenant parfois un nucléole très volumineux.

Les GBM regroupent non seulement les GBM dits classiques mais également les GBM à composante oligodendrogliale, qui correspondent à 15 à 20% des GBM (avec non seulement une majorité de cellules de type astrocytaire mais également des cellules oligodendrogiales d'aspect en « nid d'abeille » en anatomopathologie). Les GBM dont la composante majoritaire est constituée de cellules géantes représentent 5% des GBM, ils ont une localisation superficielle dans plus de 60 % des cas. Les GBM à petites cellules sont caractérisés par au moins 80% de petites cellules et non des cellules gigantocellulaires comme son nom l'indique. Enfin, les GBM peuvent correspondre à des gliosarcomes dans 2% des cas (dont les cellules ont parfois une morphologie de type sarcomateux et une différenciation mésenchymateuse) et encore plus rarement à des GBM lipidisés (caractérisés par des cellules dont le cytoplasme est surchargé en lipides) (73).

Les GBM dits secondaires, se développent sur un gliome de bas grade. Cette évolution vers un grade supérieur semble correspondre à l'accumulation d'anomalies génétiques dans un ordre chronologique déterminé. Nous décrirons ces altérations dans le chapitre sur les gènes impliqués dans le GBM.

Malheureusement, cette classification histologique a ses limites notamment quand les prélèvements histologiques ne sont pas exhaustifs. En effet, le GBM étant une tumeur hétérogène, le diagnostic n'est pas aisé notamment en cas de biopsie, qui n'a pas prélevé la zone réellement tumorale. Il est donc nécessaire de mieux caractériser ces tumeurs du point de vue subcellulaire, plus particulièrement au niveau moléculaire, pour palier ces difficultés liées à l'hétérogénéité intrinsèque tumorale.

1.1.3. Traitements

Un traitement symptomatique peut être nécessaire, des corticoïdes par exemple en cas de signes d'HTIC, des antiépileptiques en cas de crise convulsive.

Le traitement spécifique standard du GBM, chez le patient de moins 70 ans, est l'exérèse chirurgicale, suivie d'une radiochimiothérapie concomitante puis adjuvante avec du témozolomide selon le protocole publié par Stupp (74) (Cf. Figure 3). Trois posters à l'ASCO 2011 ont rapporté que ce schéma publié par Stupp est faisable et efficace dans la pratique quotidienne aux Etats-Unis, au Canada et en Autriche (75-77).

Nous allons détailler ce traitement standard, puis nous nous intéresserons au cas particulier des sujets âgés.

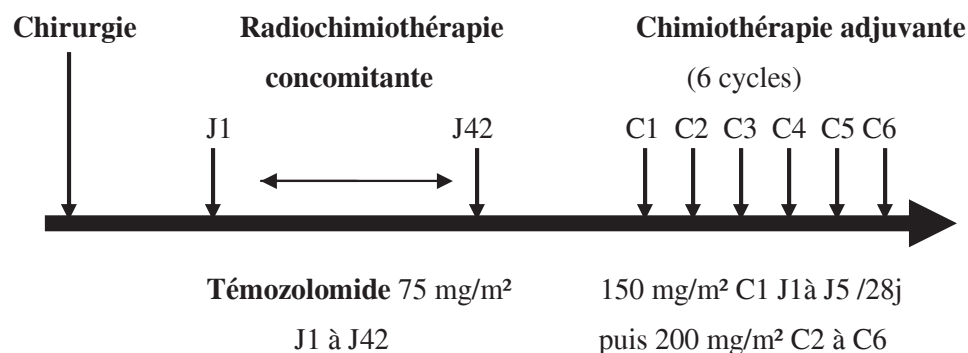


Figure 3 : schéma de traitement standard selon protocole Stupp (74).

Le traitement standard du GBM est une chirurgie suivie d'une radiothérapie associée à une chimiothérapie concomitante et adjuvante par témozolomide.

- chirurgie

La chirurgie est la pierre angulaire de la prise en charge, non seulement diagnostique mais aussi thérapeutique. Elle consiste en une exérèse la plus complète possible sans séquelle, avec une imagerie fonctionnelle préopératoire si la lésion est proche des zones à risque fonctionnel. La qualité d'exérèse est évaluée non seulement par le neurochirurgien mais aussi par une IRM post-opératoire dans les 24 heures suivant le geste (65). Le risque de morbidité est actuellement évalué entre 3 à 5%.

- radiothérapie

L'irradiation cérébrale est effectuée dans un délai optimal de 4 semaines après la chirurgie, de manière conformationnelle (avec modulation d'intensité pour certaines localisations spécifiques : région temporale...), à la dose de 60 grays (Gy) - 30 fractions de 2 Gy étalées sur 6 semaines, associée à une chimiothérapie par témozolomide à une dose de 75 mg/m² du premier au dernier jour d'irradiation sans interruption.

Le contournage permet d'établir le volume d'irradiation grâce à la définition des 3 différents volumes de référence de radiothérapie (78). Le volume de référence pour le traitement est par définition le volume tumoral macroscopique (ou Growth Tumour Volume en anglais GTV). Il s'agit du volume de la prise de contraste et/ou du volume de la cavité post-opératoire.

Le volume anatomo-clinique (ou Clinical Tumour Volume en anglais CTV) correspond à l'union du GTV et d'une zone périphérique d'infiltration tumorale, c'est-à-dire une marge de 2 à 3 cm tout en incluant la totalité de l'œdème (hypersignal T2) dans le contourage (limitée par les barrières anatomiques : faux du cerveau, os, tente du cervelet). Le volume cible prévisionnel de traitement (ou Planning Target Volume en anglais PTV) s'étend au-delà du CTV d'environ 5 à 7 mm, pour prendre en compte essentiellement les incertitudes de reproductibilité du repositionnement du patient survenant durant les 6 semaines d'irradiation. Cette marge dépend des systèmes de contention et de l'appareillage utilisé, elle est généralement de 5 mm et ne doit pas être limitée par des structures anatomiques.

Les organes à risque doivent être contourés et la dose qu'ils reçoivent doit être analysée : moins de 54 Gy pour le tronc cérébral, le chiasma et les nerfs optiques, moins de 45 Gy pour la rétine et les oreilles internes, moins de 10 Gy pour les cristallins. Un volume maximal irradiable a été défini : un tiers de l'encéphale ne doit pas recevoir plus de 60 Gy, deux tiers pas plus de 50 Gy et l'ensemble pas plus de 45 Gy (79-81).

Un essai de phase I de radio-chimiothérapie avec la chimiothérapie standard à 75 mg/m² de témozolomide et une escalade de dose de radiothérapie par modulation d'intensité (IMRT) est en cours en France (NCT01043536). Le bras expérimental reçoit au PTV 70 Gy en 28 fractions au 1^{er} niveau d'escalade de dose, 75 Gy en 30 fractions au 2^{ème} niveau et 80 Gy en 32 fractions au 3^{ème} niveau.

- chimiothérapie concomitante à l'irradiation et adjuvante

Le témozolomide ou TEMODAL® est un agent de chimiothérapie de type alkylant, de la famille des triazènes affectant la synthèse de l'ADN par alkylation de la guanine en position O6 (voire une autre en position N7). La prise est orale, nécessite d'être à jeun avant et après la prise pendant au moins 2-3 heures. Pendant l'irradiation, le témozolomide est pris de manière optimale à heure fixe 1 heure avant l'irradiation cérébrale à une dose de 75 mg/m² du premier au dernier jour d'irradiation sans interruption. Après la fin de l'irradiation, une pause de 4 semaines est nécessaire avant le début de la chimiothérapie adjuvante par témozolomide à une dose de 150 mg/m², 5 jours tous les 28 jours pour le 1^{er} cycle. La dose de témozolomide est augmentée ensuite à 200 mg/m² en cas de bonne tolérance clinique et biologique. Six cycles sont prévus en adjuvant en cas d'absence de maladie résiduelle et plus de 6 cycles en cas de poursuite de réponse ou de stabilité lésionnelle. Ceci est réalisé en pratique courante et a été validée par une étude rétrospective (82).

Des essais étudient l'adjonction d'autres molécules au traitement standard publié par Stupp. Quarante essais sont considérés comme ouverts en France selon le site www.clinicaltrial.gov, mais certains sont clos sans que ce soit précisé dans la mise à jour du site. Les molécules sont testées en fonction des sous-groupes de GBM (promoteur méthylé ou non du gène de l'enzyme O6-méthylguanine méthyl-transférase (MGMT)) et elles ciblent l'angiogenèse dont le facteur de croissance endothelial vasculaire (vascular endothelial growth factor en anglais VEGF), le microenvironnement dont les intégrines, les cellules immunitaires...

Par exemple, l'essai de phase III, CENTRIC évaluant l'adjonction au traitement standard du cilengitide, un inhibiteur d'intégrine, dans les GBM dont le promoteur du gène de la MGMT est méthylé (NCT00689221). Chez les patients ayant un GBM dont le promoteur *MGMT* non méthylé, un essai de phase II randomisé de l'organisation européenne pour la recherche et le

traitement du cancer (European Organisation for Research and Treatment of Cancer en anglais EORTC) EORTC 26082 compare actuellement le traitement standard plus ou moins associé au temsilorimus, inhibiteur de mTOR (NCT01019434).

Chez les patients ayant un GBM non résécable, un essai de phase II randomisé, TemAvir, a évalué un traitement néoadjuvant et adjuvant par bévacizumab et irinotécan en plus de la radio-chimiothérapie concomitante par témozolomide (NCT01022918). Bien que le bras expérimental a augmenté la survie sans progression (SSP) à 6 mois de 41% à 65,1%, il n'a pas permis de valider l'hypothèse initiale d'une SSP à 6 mois de 66 %. L'étude est donc statistiquement négative (83). Plusieurs causes sont possibles : le début de la radiothérapie retardé de 3 mois par le traitement néoadjuvant bévacizumab-irinotécan, l'absence de chimiothérapie adjuvante par témozolomide, ou la sélection des patients (sous-groupes de mauvais pronostic de classe V selon l'EORTC). Un début de réponse peut-être évoqué par les résultats concernant la SSP de l'essai AVAGLIO, phase III randomisée, qui a évalué l'efficacité de l'association du bévacizumab au traitement standard avec un bénéfice en terme de SSP (6,2 versus 10,6 mois, HR=0,64 IC95% [0,55-0,74] $p < 0,0001$) et de qualité de vie sans impact sur la survie globale (SG) pour l'instant d'après la présentation lors du congrès de la société de neuro-oncologie américaine et de l'association des neuro-oncologues d'expression française (ANOCEF) cette année par Professeur Chinot (NCT00943826).

D'autres approches thérapeutiques sont également étudiées. Par exemple, NovoTTF-100A inhibe la croissance tumorale par inversion des champs électriques à basse fréquence grâce aux électrodes posées sur le crâne du patient 22h sur 24. Un essai évalue l'efficacité de son association avec le traitement standard (NCT00916409).

L'immunothérapie a été étudiée sous diverses formes, les essais de vaccination ciblant le récepteur du facteur de croissance épidermique (epidermal growth factor receptor en anglais EGFR) semblent les plus prometteurs. Normalement le facteur de croissance épidermique (epidermal growth factor en anglais EGF) se lie à son récepteur EGFR qui est surexprimé à la surface des cellules de GBM pour induire la croissance cellulaire (84). Dans les tumeurs cérébrales contrairement au tissu sain, l'EGFR peut être muté et ainsi activé, il s'agit du variant III de l'EGFR (EGFRvIII). Il favorise la prolifération cellulaire et la survie des cellules souches neurales murines et bloque la différenciation neuronale (85).

Le rindopepimut ou PePvIII, est un peptide de 13 acides aminés avec une cystéine additionnelle en position terminale couvrant la mutation EGFRvIII. Une étude de phase II de vaccination à base de PePvIII en injections intradermiques avec du facteur de croissance des granulocytes et macrophages (granulocyte macrophage colony stimulating factor en anglais GM-CSF) chez des patients sélectionnés, après résection complète ou supérieure à 95% de la tumeur, sans progression après la radiochimiothérapie, a mis en évidence une réponse immune (anticorps et réaction d'hypersensibilité retardée) avec un impact dans ce cas sur la SG. De plus, seuls deux patients réopérés lors de la récurrence présente une expression d'EGFRvIII en IHC dont une est faible inférieure à 1%, les 9 autres n'ont plus d'expression d'EGFRvIII (86) (NCT00643097). Cela semble témoigner de l'efficacité de la vaccination pour éradiquer les clones EGFRvIII positifs. La SG des 6 patients ayant développé une réponse immune est significativement plus longue (47,7 versus 22,8 mois).

Ceci a incité à la réalisation d'un essai de phase III aux Etats-Unis, auquel s'est annexé dernièrement l'essai européen initialement prévu (EORTC 26111-22115).

Le cas particulier du sujet âgé est de plus en plus étudié, en effet le protocole publié par Stupp était limité aux patients âgés de moins de 70 ans. Cependant se pose tout d'abord la question de la définition du sujet âgé, qui n'est pas la même d'un pays à l'autre : plus de 60, 65, 70 ou plus de 75 ans. D'autre part, l'état général du patient est très important à prendre en compte pour définir la stratégie thérapeutique, car l'état physiologique n'est pas toujours en rapport avec l'âge réel du patient.

Actuellement plusieurs possibilités de prise en charge sont possibles chez le sujet âgé:

- le protocole publié par Stupp pour le sujet âgé en bon état général
- une radiothérapie exclusive hypofractionnée (40,5 Gy en 15 fractions (87) ou 50 Gy en 25 fractions (88), qui amène un gain de survie dans une étude de phase III par rapport aux soins palliatifs de confort),
- une monochimiothérapie par témozolomide, qui semble apporter un bénéfice clinique en phase II (étude TAG) notamment si l'état général est altéré (89) (NCT01242566).

Plus récemment, les essais de phase III randomisée NORDIC ET NOA-08 ont mis en évidence que si le statut de l'enzyme MGMT n'est pas connu ou si le promoteur n'est pas méthylé, il vaut mieux traiter les sujets âgés par une irradiation hypofractionnée et ne proposer la chimiothérapie exclusive qu'en cas de méthylation du promoteur (90;91) (NCT00820963 et NCT01502241).

Un essai randomisé de phase III de l'EORTC 26062-22061 compare actuellement une radiothérapie accélérée à cette même irradiation de 40,5 Gy en 15 fractions associée à du témozolomide concomitant et adjuvant chez les patients âgés de plus de 70 ans (NCT00482677).

Une phase II ATAG étudie l'association du témozolomide et du bévacicumab chez les sujets âgés ayant un indice de performance status selon Karnofsky (Karnofsky performance status en anglais KPS) supérieur ou égal à 60 % (NCT01149850).

1.1.4. Pronostic

Malgré les progrès récents dans la prise en charge thérapeutique des GBM, le pronostic reste péjoratif avec une survie médiane d'environ 15 mois (74). L'actualisation de l'essai de phase III à l'origine du traitement standard publié par Stupp a mis en évidence environ 10% de longs survivants à 5 ans (92). Ainsi non seulement la tumeur est hétérogène mais le pronostic aussi, amenant une classification basée sur des classes de partitionnement appelées en anglais Recursive Partitioning Analysis (RPA) établies par le groupe américain d'oncologie radiothérapique (en anglais Radiation Therapy Oncology Group RTOG) (93) et modifiées par EORTC (94). Les critères de classification sont les suivants : âge (plus de 50 ans ou non), l'indice de performance status (PS) selon l'OMS, la qualité de l'exérèse (chirurgie complète ou subtotale versus biopsie), l'état neurologique notamment l'examen minimal test (MMSE). La survie des patients inclus dans le bras expérimental de l'essai EORTC 26981/22981-NCIC de phase III (74) montrant l'intérêt de l'adjonction du témozolomide a été analysée selon la classification RPA modifiée. Elle est décrite dans le tableau 1.

RPA	Age	PS	Chirurgie	Etat Neurologique	Survie médiane	Survie à 2 ans
III	< 50	0	Oui	≥ 27	21,4 mois	43,4 %
IV	< 50	1-2	Oui	≥ 27	16,3 mois	27,9 %
	≥ 50	0-1-2	Oui	≥ 27		
V	≥ 50	0-1-2	Biospie	< 27	10,3 mois	16,5 %

Tableau 1 : groupes RPA modifiés des GBM (94).

Les GBM sont regroupés en 3 classes pronostiques selon l'âge, le performance status (PS), la chirurgie et l'état neurologique. La survie médiane et la survie à 2 ans rapportées sont celles du bras expérimental de l'essai publié par Stupp, qui est devenu le traitement standard.

Cette classification permet de définir des groupes de patients ayant des survies globales différentes, que ce soit la survie médiane, la survie à 1 an et à 3 ans. Cette classification simplifiée a été validée et est désormais appliquée dans les essais thérapeutiques (95).

Comme on l'a décrit précédemment, le pronostic reste péjoratif avec une survie médiane courte de 15 mois après le traitement standard de chirurgie suivie par une radiothérapie associée à une chimiothérapie concomitante et adjuvante par témozolomide. Sans traitement le décès du patient survient dans les 3 mois environ après le diagnostic, la résection chirurgicale seule allonge la survie de 6 mois et la radiothérapie adjuvante exclusive l'allonge de 9 mois (10). Avant l'avènement de la radio-chimiothérapie (96), le pronostic des GBM secondaires reste plus favorable que celui des GBM de *novo* (médiane de survie de 7,8 versus 4,7 mois $p=0,003$). Les étiologies de cette issue fatale sont la résistance aux traitements (97;98) et/ou la récurrence (99). Plusieurs causes ont été évoquées, notamment au niveau anatomique avec la BHE, mais également au niveau cellulaire avec la mise en évidence des cellules souches (ou encore appelées cellules initiatrices de tumeur) (100-102).

1.1.5. Traitement de la récurrence

La prise en charge thérapeutique de la récurrence ou de la progression tumorale dépend en premier lieu de la prise en charge thérapeutique initiale. Ainsi la grande majorité des patients opérés d'un GBM puis traités par un protocole standard de radio-chimiothérapie concomitante et adjuvante selon le schéma publié par Stupp, présenteront une récurrence, dont la prise en charge reste difficile. Elle est discutée au cas par cas en réunion de concertation pluridisciplinaire de neuro-oncologie.

Une ré-intervention doit être privilégiée si celle-ci est envisageable car elle semble apporter un bénéfice chez des patients sélectionnés (103). Cependant aucun essai randomisé n'a été

réalisé pour le prouver formellement. La réintervention peut être associée à une chimiothérapie *in situ* comme l'utilisation de pastilles de carmustine GLIADEL® (104;105). Ce traitement nécessite une confirmation histologique d'où son utilisation surtout lors de la récurrence. Le GLIADEL® est parfois placé en cas d'exérèse quasi-complète lors de la prise en charge initiale du GBM après confirmation histologique extemporanée. La combinaison avec le protocole de Stupp est réalisable (106;107) mais aucun bénéfice n'a été mis en évidence dans une étude rétrospective comparative (108). De plus, aucune étude prospective randomisée n'a évalué son intérêt en plus du traitement standard initial. La tolérance semble correcte même en cas de récurrence (109). Cependant, d'autres études montrent une augmentation des complications iatrogènes (méningite, œdème, abcès, retard de cicatrisation) altérant la qualité de vie (110). De plus, le bénéfice du GLIADEL® en récurrence n'a pas été mis en évidence dans la méta-analyse publiée par Cochrane de Hart (111).

Une ré-irradiation peut être discutée en réunion de concertation pluridisciplinaire en condition stéréotaxique en fonction de la dose délivrée et du délai par rapport à l'irradiation initiale (112-115). Cependant, aucun essai randomisé n'a évalué le bénéfice de cette ré-irradiation.

La chimiothérapie et les traitements médicaux ont été les plus étudiés et sont actuellement les plus utilisés en cas de récurrences. Les essais de phase II utilisant des traitements systémiques comme les nitrosourées (bélustine, carmustine, fotémustine), la procarbazine, le cisplatine ou l'irinotecan mettent en évidence des taux de réponse faibles d'environ 6%, une survie sans récurrence à 6 mois d'environ 15% et une survie globale à partir de cette récurrence comprise entre 3 à 6 mois (116). Un essai de phase III étudie l'efficacité dans les GBM récidivant de la lomustine 100 à 130 mg/m² en une prise toutes les 6 semaines comparée à l'enzastaurin, inhibiteur de la protéine kinase C α , β , γ , ϵ , 1125 mg puis 500 mg pris oralement en continu (NCT00295815). La reprise du témozolomide est discutée en réunion de concertation pluridisciplinaire surtout si l'intervalle libre entre l'arrêt du témozolomide adjuvant et la

récidive est long. Plusieurs schémas d'administration ont été rapportés (standard, continu ou accéléré) (117;118). Les schémas dit dose-dense ont été développés pour saturer l'enzyme MGMT et limiter ainsi la résistance au témozolomide (119). Cependant une étude randomisée (RTOG 0525) n'a pas mis en évidence de bénéfice de ce schéma dose-dense (120;121) par rapport au schéma standard dans la prise en charge initiale. Un essai de phase II randomisée compare dans le GBM récidivant l'efficacité du témozolomide ou carmustine à l'erlotinib (TARCEVA®) en continu, un inhibiteur de tyrosine kinase de l'EGFR (NCT00086879).

Non seulement le GBM est une tumeur hypervascularisée, mais nous savons que certaines molécules interagissent sur la BHE et la perméabilité capillaire dont notamment le VEGF. Il est produit par la tumeur et le microenvironnement tumoral. Le VEGF joue ainsi un rôle important dans le GBM notamment dans l'angiogenèse et dans les voies de signalisation qui favorisent la croissance tumorale (122). Il s'agit d'une cible potentielle thérapeutique avec un traitement spécifique déjà utilisé en clinique dans d'autres pathologies cancéreuses : un anticorps anti-VEGF, le bévacizumab (123). L'inhibition de l'angiogenèse via cet anticorps associé à l'irinotécan ont permis dans un essai de phase II, d'obtenir des taux de réponse élevés de 57% et une SG à 6 mois de 77% (124). Ces données ont permis l'obtention de l'autorisation de mise sur le marché du bévacizumab aux Etats-Unis, mais pas encore en Europe. Une méta-analyse a confirmé ce bénéfice clinique avec un taux de réponse élevé et une bonne tolérance (30% d'hypertension artérielle, 10% de thrombose veineuse profonde et embolie pulmonaire, 3% d'hémorragie intratumorale, et moins de 1% de leuco-encéphalopathie postérieure) (125). Cependant l'adjonction d'irinotécan au bévacizumab, qui permet un meilleur taux de réponse, ne met pas en évidence de bénéfice sur la survie (126).

L'observatoire inter-régional des médicaments et de l'innovation thérapeutique (OMIT) Bretagne et Pays de Loire qui avait autorisé l'administration de l'association irinotécan et bévacizumab, a présenté aux congrès de l'ANOCEF et de l'ASCO en 2011 les données

d'efficacité d'une cohorte de plus de 200 GBM traités (127;128) avec une SSP médiane de plus de 5 mois et une SG médiane de 7,87 mois. La majorité des patients (85%) avait un bénéfice clinique à 3 mois.

Nous avons réalisé une étude rétrospective monocentrique (Centre Eugène Marquis) de cohortes historiques de la prise en charge des patients ayant une récurrence après un protocole thérapeutique selon Stupp, comparant un traitement par chimiothérapie conventionnelle à l'association irinotécan et bévacizumab. Il a été mis en évidence une SG de 11,5 et 5 mois dans les cohortes traitées respectivement par l'association d'irinotécan et bévacizumab et par la chimiothérapie conventionnelle (129). Il s'agit d'une analyse rétrospective de cohorte comportant par définition de nombreux biais, cependant elle reflète notre pratique clinique, hors essai, de neuro-oncologie avant et après les résultats de la phase II associant irinotécan et bévacizumab dans les GBM récidivant.

ARTICLE N°1 (129)

Analyse rétrospective de 24 glioblastomes récidivant après radiochimiothérapie concomitante et traités par nitrosoures ou par l'association irinotécan et bévacizumab.

Vauléon E, Mesbah H, Gédouin D, Lecouillard I, Louvel G, Hamlat A, Riffaud L, Carsin B, Quillien V, Audrain O, Lesimple T.

Bull Cancer. 2012 Feb 1; 99 (2), 121-126.

Un essai de phase II randomisée de l'EORTC 26101 étudie actuellement l'intérêt de l'association et/ou la séquence de lomustine et bévacizumab en 1^{ère} ligne de GBM récidivant (NCT01290939). Dans le GBM, après un traitement par un anticorps anti-VEGF, il a été montré que 46 % des récurrences étaient caractérisées par une augmentation de l'infiltration ne prenant pas le contraste (130-133). Des analyses étudiant biologiquement ce phénomène sont en cours ; il a été rapporté une surexpression de c-Met dans les lésions invasives (134). Des études pilotes avec des thérapeutiques anti-c-Met lors de progression sous bévacizumab sont également en cours de développement après des études précliniques prometteuses (135).

Une phase II à 3 bras évalue l'efficacité et la tolérance de l'anticorps anti-c-Met : onartuzumab, en combinaison au bévacizumab, versus les 2 traitements administrés en monothérapie dans le GBM récidivant (NCT01632228).

D'autres thérapeutiques ciblant le VEGF sont en cours d'étude dans les gliomes de haut grade. Malheureusement, les essais déjà publiés ou présentés lors de congrès sur l'efficacité des inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) ciblant entre autres le VEGFR (pazopanib, sunitinib, aflibercept, cediranib, sorafenib, vatalanib, lenvatinib) dans les GBM ou les gliomes de haut grade sont tous négatifs en phase I ou II (136-143) ou en phase III (144). De plus, un traitement de rattrapage par bévacizumab après un ITK ciblant VEGFR est moins efficace qu'en première intention (5 réponses sur 73 patients) (145;146) .

1.2. Gènes et GBM

1.2.1. Généralités sur les méthodes d'analyse des gènes

Le génome représente l'ensemble du matériel génétique d'un individu et contient environ 30000 gènes chez l'homme. La génomique correspond à l'étude structurale et fonctionnelle du génome. Elle porte notamment sur l'établissement de la séquence complète génomique et l'étude de ses variations, mais également sur l'analyse systématique de l'expression des gènes séquencés et l'inférence de leurs fonctions.

Le transcriptome est l'ensemble des transcrits de gènes présents à un moment donné et lors d'une situation biologique déterminée, c'est-à-dire l'ensemble des ARN messagers, qui seront potentiellement traduits en protéines. Cette étude est souvent limitée à un type tissulaire ou cellulaire pour analyser l'expression du génome dans des circonstances particulières (physiologiques, pathologiques...).

Le protéome est l'ensemble des protéines exprimées à un moment donné. Cette analyse est également limitée à un tissu ou un type cellulaire. Cette étude est plus complexe car un gène peut coder plusieurs protéines qui peuvent subir des modifications post-traductionnelles (clivage, glycosylation, phosphorylation, acétylation...).

La puce à ADN ou biopuce permet d'analyser en une seule expérience, les variations de la structure du génome ou de leur expression (transcriptome). L'analyse de la structure du génome s'effectue généralement par rapport à un échantillon de référence. Une puce peut contenir une partie ou l'ensemble du génome sous forme de molécules d'ADN fixées en rangées ordonnées sur une matrice de verre, silicium ou plastique. Le principe de la biopuce repose sur les propriétés d'hybridation du brin d'ADN dénaturé et du brin complémentaire. Les bases de l'ADN (Adénine, Guanine, Cytosine, Thymine) se lient par des liaisons hydrogènes (entre Adénine et Thymine ou Cytosine et Guanine). La puce d'hybridation génomique comparative (CGH-array) est une puce à ADN qui permet d'analyser le nombre de copies d'ADN d'intérêt, grâce au rapport de fluorescence de l'ADN test par rapport à l'ADN de référence marqués par des fluorochromes différents. L'analyse quantitative et statistique des données exprimées en \log_2 du rapport de l'intensité de fluorescence permet l'identification de variations du nombre de copies de fragment d'ADN pouvant correspondre à différents types d'aberrations chromosomiques (insertion, délétion, translocations équilibrées, amplification). Ainsi, les différents niveaux moléculaires étudiés par la génomique (le génome, l'épigénome et le transcriptome en particulier) peuvent être analysés de manière conjointe par des méthodes de génomique intégrative.

Enfin, l'annotation fonctionnelle de réseaux de co-expression de gènes (co-expression network) ou de groupes de gènes est une méthode d'analyse qui permet d'inférer les fonctions biologiques de groupes ou classes ou modules de gènes ainsi que les voies de signalisation associées. On parle de contextualisation biologique. Cette méthode permet de mettre en valeur les corrélations fortes qui existent entre des profils d'expression de gènes et de grouper les gènes en modules ou classes de co-expression. En particulier, les gènes hautement connectés dits « hub » gènes jouent potentiellement un rôle clé dans la compréhension, le comportement biologique et la régulation du module de co-expression.

1.2.2. Principaux gènes impliqués dans le GBM

Ces diverses technologies révolutionnaires, dites à haut-débit, ont permis d'identifier ou de mieux caractériser les gènes impliqués dans la gliomagenèse et de créer un atlas du génome des GBM et de ses altérations par le consortium TCGA (The Cancer Genome Atlas) (147). Les aberrations les plus fréquentes dans le GBM sont le gain du chromosome 7 avec ou sans amplification de gène *EGFR*, la perte du bras court du chromosome 9 avec ou sans délétion du gène *CDKN2A* (cycline dépendante kinase N2A) et la perte du chromosome 10.

1.2.2.1. Description des gènes

La voie *EGFR/RAS/NF1/PTEN/PI3K* a pour but de promouvoir la prolifération et d'inhiber l'apoptose. Les ligands l'EGF, le facteur de croissance de transformation α (en anglais transforming growth factor TGF α), le facteur de croissance dérivé des plaquettes (en anglais platelet derived growth factor PDGF) se fixent sur leurs récepteurs membranaires EGFR et le récepteur du PDGF le PDGFR, activant la phosphatidil-inositol-3 kinase (PI3K) ou RAS. PI3K active AKT puis mTOR. Le consortium TCGA a mis en évidence des altérations de *RAS* dans 18% des GBM, *PTEN* dans 36%, *PI3KR* dans 15%, *EGFR* dans 45%, *ERBB2* dans 8%, *PDGFRA* dans 13%, *MET* dans 4%, *AKT* dans 2 %.

La voie *TP53/MDM2/MDM4/p14* est également altérée dans 87% des GBM. Le gène *TP53* code pour une protéine (protéine 53 P53) qui contrôle le cycle cellulaire : elle induit l'apoptose en cas de dépassement du système de réparation et en induisant la transcription du gène *P21* qui bloque le passage de la phase G1 à S du cycle. L'expression de P53 est contrôlée par l'E3 ubiquitine ligase appelée MDM2 qui la dégrade, si *p14^{ARF}/CDKN2A* n'est pas activée. Le TCGA a mis en évidence des mutations ou délétions homozygotes de *TP53* dans 35% des GBM, surtout secondaires, une mutation de *CDKN2A/p14^{ARF}* dans 49% des GBM, une amplification de *MDM2* dans 14% des GBM.

La voie *p16^{INK4a}/CDK4/RB1* est altérée dans 78 % des GBM. Le complexe cycline dépendante kinase 4 CDK4-cycline D libère le facteur de transcription E2F en phosphorylant le gène du rétinoblastome 1 (*RB1*). La protéine *p16^{INK4a}* inhibe ce complexe, contrôlant le cycle cellulaire et notamment le passage G1/S. Il a été retrouvé une délétion homozygote ou une mutation de *CDKN2A/p16^{INK4a}* dans 52% des GBM, une délétion homozygote ou une mutation de *RB1* dans 11% ou une méthylation de son promoteur dans 11% des GBM de novo et 43% des GBM secondaires.

Dans les GBM à composante oligodendrogliale (GBMO), on retrouve ces anomalies mais aussi dans une majorité des cas celles associées au contingent oligodendroglial : une perte de l'hétérozygotie du chromosome 1p et/ou celle du chromosome 19q (96;148-150) . Seule la vraie codélétion 1p-19q semble associée à un meilleur pronostic dans les GBMO (151).

Les GBM secondaires sont souvent désormais décrits comme des « GBM *IDH* muté ». En effet, une mutation du gène de l'isocitrate déshydrogénase (*IDH*) est retrouvée quasiment exclusivement dans les GBM secondaires et non de *novo* (152;153). La mutation plus fréquente, R132H touche le gène *IDH1* et représente 93% des mutations, elle peut être mise

en évidence par IHC ou par séquençage (154). L'analyse moléculaire n'est actuellement nécessaire qu'en absence de fixation par l'anticorps en IHC (155), qui détecte 100% des mutations R132H, et pour rechercher les autres mutations d'*IDH1* et les mutations d'*IDH2*. Les gènes *IDH1* et *IDH2* codent normalement pour les isocitrates déshydrogénases 1 et 2, qui catalysent la carboxylation oxydative de l'isocitrate en α -kétooglutarate en induisant du nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) dans le cytosol ou la mitochondrie (cycle de Krebs). La mutation de ces gènes induit non seulement une production de l'oncométabolite 2-hydroxyglutarate (2HG) qui est un inhibiteur compétitif des réactions cellulaires α -kétooglutarate dépendantes, mais également une dysrégulation du facteur induit par l'hypoxie-1 α (en anglais hypoxia-inducible factor HIF-1 α) (156;157). Les mutations des gènes *IDH* joueraient ainsi un rôle important dans la tumorigenèse bien que les mécanismes utilisés ne sont pas encore clairement élucidés : le 2HG inhiberait la déméthylation des histones qui serait suffisante pour bloquer la différenciation des cellules non transformées et être à l'origine du phénotype méthylateur GCIMP (158-160).

Ces données de gliomagenèse amènent l'hypothèse que les GBM dériveraient d'une transformation néoplasique de précurseurs gliaux ou de cellules souches (102). Les GBM secondaires dériveraient d'une transformation maligne d'un précurseur glial commun aux astrocytes et oligodendrocytes suite à une mutation d'*IDH1*. Les marqueurs cellulaires de ces précurseurs varient dans les études, avec des expressions possibles du ganglioside A2B5, de la protéine chondroïtine sulfate protéoglycane NG2, la protéine d'adhésion cellulaire neurale (en anglais neural cell adhesion molecule NCAM) et le récepteur α du PDGF (161). Les GBM de *novo* dériveraient des cellules souches neurales. Par définition, les cellules souches ont les capacités non seulement de proliférer et de se différencier mais aussi de s'autorenouveler et d'initier des tumeurs (162). Nous développerons ce sujet dans un prochain paragraphe.

Les gliomes pourraient ainsi être considérés comme issus de ces cellules dites « précurseurs gliaux », qui se différencient secondairement selon les altérations génétiques en morphologies cellulaires différentes (astrocytaire et/ou oligodendrogliale) et en stades différents (bas grade, anaplasique ou grade IV) (Cf. Figure 4).

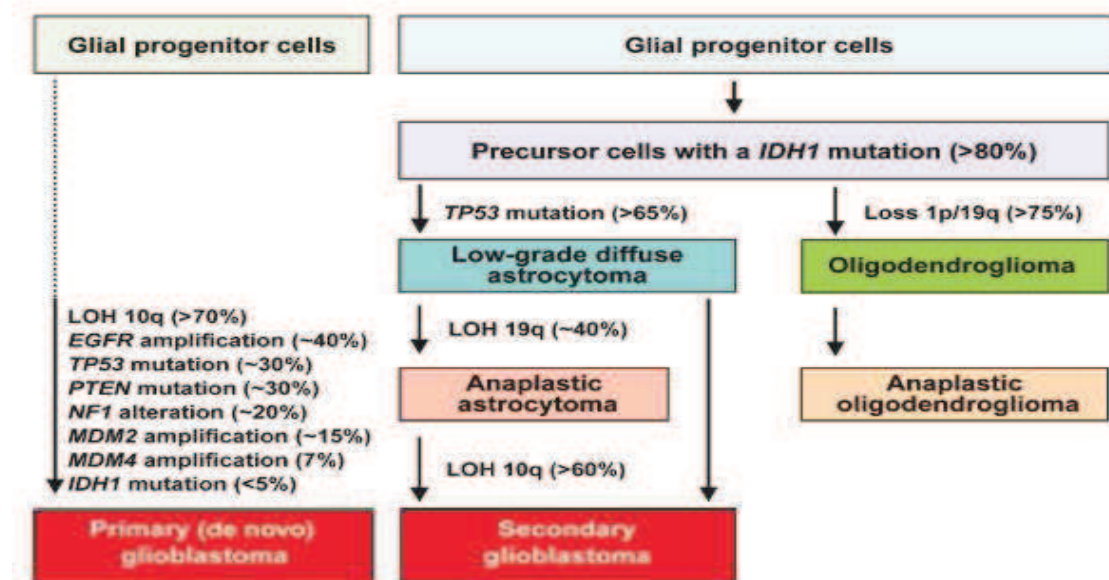


Figure 4 : schéma de gliomagenèse d'après Ohgaki et al, 2009 (163).

Les gliomes ont différentes altérations génétiques en fonction du type cellulaire et du grade, permettant notamment de distinguer les GBM secondaires et primaires. Les altérations génétiques les plus fréquemment retrouvées dans le GBM sont la perte d'hétérozygotie 10q, l'amplification de l'*EGFR*, la mutation de *TP53*, la mutation de *PTEN*, l'altération de *NF1*, l'amplification de *MDM2* et *MDM4* et plus rarement la mutation d'*IDH1*.

Les profils d'expression géniques rapportés dans la littérature ont permis de distinguer des sous-groupes de GBM : proneuraux, mésenchymateux, proliférants selon Phillips et *al.* (164), ou proneuraux, mésenchymateux, classiques et neuraux selon Verhaak et *al.* (147). Les deux groupes semblant les plus robustes sont donc les proneuraux et les mésenchymateux (165).

Le sous-groupe de GBM dit mésenchymateux est de moins bon pronostic, incluant une majorité de GBM avec nécrose. Les anomalies moléculaires intéressent les gènes *CHI3L1*, *CD44* et *VEGF*.

Le sous-groupe de GBM dit proneural comporte une fréquence élevée de GBM secondaires, de GBM avec composante oligodendrogliale et de sujets jeunes lors du diagnostic. Du point de vue moléculaire, il présente un taux élevé de mutations du gène *IDH1*, des altérations du gène *PDGFRA* et de mutations du gène *TP53*. La survie des patients appartenant à ce sous-groupe est plus longue que celle des autres sous-groupes (147;164).

1.2.2.2. Intérêt dans la prise en charge des patients

En neuro-oncologie, ces données d'analyses génomiques et transcriptomiques sont actuellement utilisées comme une aide diagnostique, pronostique et prédictive de réponse aux traitements.

Du point de vue diagnostique, ces classifications biologiques semblent meilleures que le grade histologique par leur reproductibilité, leur robustesse indépendante des anatomopathologistes et leur corrélation avec la survie (166;167). Le diagnostic de gliome peut être aussi facilité par les analyses transcriptomiques, qui ont permis de distinguer les gliomes de bas et de hauts grades (147;164;168), les anaplasiques des GBM (169) selon les gènes différentiellement exprimés, pour pouvoir proposer le traitement le plus optimal aux patients. Dans notre équipe, Marie de Tayrac et Marc Aubry ont effectué une méta-analyse de données de puces de 3 jeux de données concernant 267 patients ayant un gliome de haut grade, dont 144 avec des données de survie. Ils ont établi un modèle de risque basé sur l'expression pondérée de 4 gènes (*CHAF1B*, *PDLIM4*, *EDNRB*, et *HJURP*), qui a été validé sur deux cohortes locales de 59 et 194 patients (169). Elle permet de séparer les gliomes de haut grade selon la survie globale (hazard ratio= 0.46; avec un intervalle de confiance à 95 % entre 0.26 à 0.81; p=0.007). Cette signature est plus robuste que l'histologie pour séparer les gliomes de haut grade indépendamment du statut de *MGMT* et *IDH*.

Du point de vue pronostique, nous avons déjà souligné le caractère pronostique des mutations d'*IDH1,2* dans les GBM. Aucun autre biomarqueur ne s'est avéré pronostique de manière robuste pour l'instant (147;164). Néanmoins, la classification basée sur les profils transcriptomiques (proneuraux, mésenchymateux, autres) est associée à un impact pronostique mais qui est en partie lié à la présence des mutations *IDH1*.

Du point prédictif de réponse au traitement, seul le statut de méthylation du promoteur de *MGMT* a été confirmé vis-à-vis de la réponse au témozolomide. L'absence de méthylation de *MGMT* est un facteur reconnu de résistance au témozolomide (92;170). Les anomalies de l'ADN sont reconnues par un système de reconnaissance et de réparation des mésappariements de l'ADN dit mismatch repair (MMR). La protéine de réparation MGMT enlève le groupe méthyl en position 6 de la guanine comme son nom l'indique. L'action du témozolomide est donc contrecarrée par la MGMT, conférant une résistance (Cf. Figure 5). En absence de protéine MGMT, les anomalies de l'ADN induites par le témozolomide ne sont pas réparées, les cellules entrent en apoptose. Inversement, en absence de méthylation du promoteur du gène de la MGMT, la MGMT est transcrite et les cellules sont alors résistantes au témozolomide avec un impact négatif sur la survie.

ARTICLE N°2 (171)

Intérêt de la MGMT dans les gliomes.

Quillien V, **Vauléon E**, Saikali S, Lesimple T, Hamlat A, Etcheverry A, Mosser J.

Bull Cancer. 2011 Mar ; 98 (3) : 291-303.

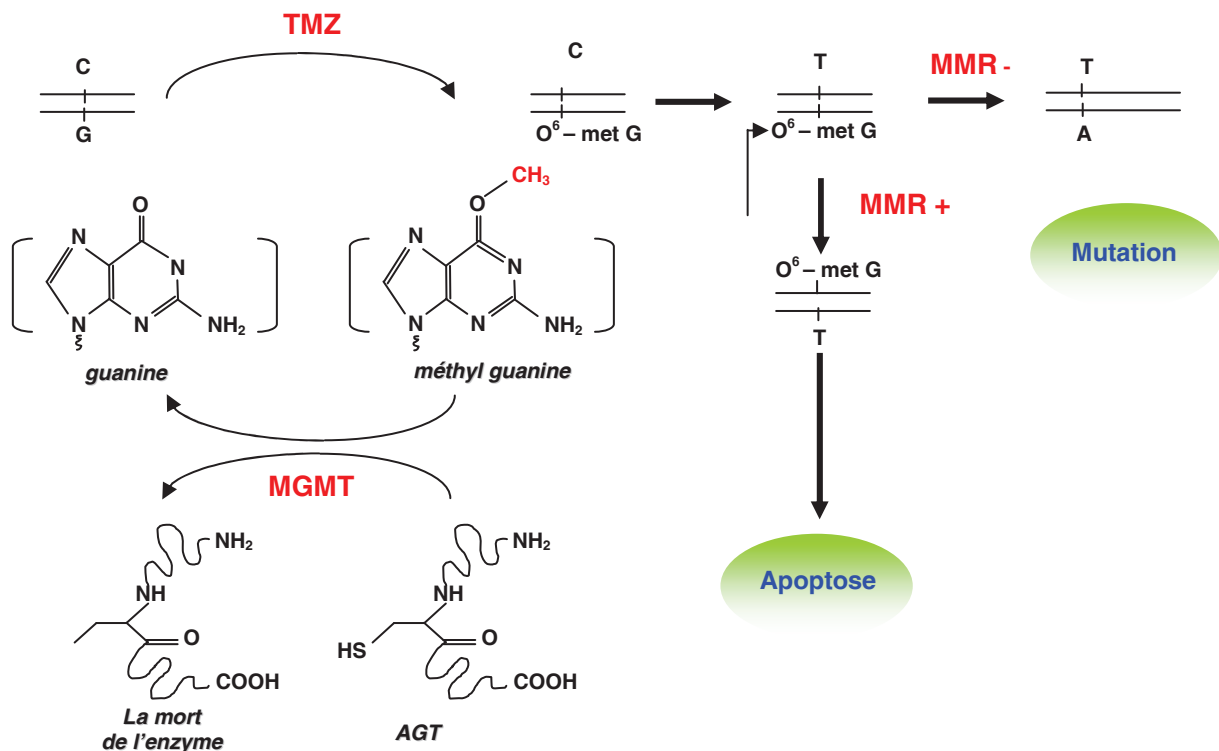


Figure 5 : mode d'action de la MGMT.

Le système mismatch repair (MMR) reconnaît les mésappariements de l'ADN créés entre autres par le témozolomide et la MGMT enlève le groupe méthyl en position 6 guanine. Si le MMR est fonctionnel (+) et la MGMT inhibée par la méthylation de son promoteur, le témozolomide est efficace : la cellule entre en apoptose.

Les essais thérapeutiques analysent actuellement les résultats en stratifiant les patients sur le statut fonctionnel ou pas de la MGMT, voire sélectionnent les patients selon ce statut. La détermination du statut fonctionnel de la MGMT peut être effectuée par plusieurs méthodes : la mise en évidence ou non de la protéine par IHC, l'expression ou non de l'ARN messager et la méthylation ou non du promoteur par techniques de biologie moléculaire... Une étude française, nommée ECOM, actuellement close aux inclusions, a comparé les qualités techniques et l'intérêt clinique de 5 de ces méthodes (MS-PCR, MethyLight, pyroséquençage, MS-HRM, IHC), pour déterminer la meilleure d'entre elles puis standardiser la procédure de diagnostic de biologie moléculaire (172) (NCT01345370). Cette étude montre que le pyroséquençage, en permettant la mesure quantitative et absolue du niveau de méthylation du promoteur, est la méthode testée la plus reproductible et la plus sensible. De ce fait, elle permet une bonne prédiction de la survie.

Ceci permettra dans l'avenir d'adapter la prise en charge en fonction du statut du promoteur de *MGMT*. Cependant, aucune alternative thérapeutique au protocole classique n'est actuellement validée en adjuvant en première ligne.

L'importance de ce statut et de sa valeur prédictive de réponse au témozolomide a cependant été démontrée dans le GBM du sujet âgé dans deux essais de phase III randomisée (NORDIC et NOA08). Dans l'essai NOA-08 (91), si le promoteur est méthylé, la médiane de survie sans événement est de 8,4 mois en cas de chimiothérapie par témozolomide versus 4,6 mois en cas de radiothérapie. Aucune différence n'est retrouvée dans le groupe traité par radiothérapie quel que soit le statut de *MGMT*. Ces résultats incitent à rechercher le statut *MGMT* chez le sujet âgé pour proposer du témozolomide en cas de méthylation ou de la radiothérapie en cas d'absence de méthylation ou si le statut ne peut être déterminé.

Dans notre équipe, Amandine Etcheverry a étudié les variations du méthylome de patients atteints de GBM. Elle a mis en évidence des variations épigénétiques à valeur pronostique. Le niveau de méthylation des promoteurs de 4 gènes: *FNDC3B*, *TBX3*, *DGKI*, et *FSD1* reflèterait la résistance du GBM au traitement standard de radio-chimiothérapie concomitante et adjuvante selon le protocole Stupp (173).

Ces données génomiques et transcriptomiques seront probablement une aide essentielle au design des futurs essais cliniques.

1.2.3. Gènes immuns

1.2.3.1. Généralités sur GBM et immunité

1.2.3.1.1. Preuve de la fonctionnalité du système immun dans le GBM

Etant donné le lien entre des antécédents d'infections virales, d'allergies et l'incidence des gliomes, le système immun pourrait intervenir dans la gliomagenèse.

Longtemps, le système nerveux central (SNC) a été considéré comme un organe immuno-privilégié (174). En effet, la BHE a été décrite comme une barrière anatomique et physiologique, le protégeant de la circulation périphérique (175) et aucune structure lymphatique n'avait été mise en évidence (174;176;177). De plus, aucun lymphocytes T (LT) quiescent n'a été retrouvé dans le cortex cérébral lors d'une série d'autopsies (178). Enfin, la greffe tumorale est plus facile dans le cerveau que dans les autres organes (179-182).

Cependant, plusieurs données réfutent ce dogme. Premièrement, il a été montré dans des modèles animaux la possibilité d'induire une réaction immunitaire spécifiquement dirigée contre des déterminants antigéniques tumoraux. Les cellules dendritiques pulsées avec un antigène, injectées en intra-cérébral, quittent le parenchyme cérébral en migrant le long de la capsule externe pour se rendre au niveau des ganglions cervicaux où va être initiée la réponse immunitaire spécifique (183). Les lymphocytes spécifiques qui prolifèrent dans les ganglions drainants ont un phénotype particulier qui leur procure un tropisme vers le cerveau. Ce phénomène, connu sous le nom « d'imprinting » en anglais ne serait cependant pas dû à l'environnement ganglionnaire. Dans le modèle d'implantation tumorale cérébrale décrit par Calzascia et *al.*, des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) interviennent dans ce phénotype particulier (184). Deuxièmement, une activité immune phagocytaire est présente avec la microglie, les macrophages infiltrant la tumeur (tumour-associated macrophage en

anglais TAM) (185). La microglie peut représenter jusqu'à un tiers des cellules d'un GBM (186). Les macrophages associés aux tumeurs peuvent également induire une immunosuppression (187). De plus, il existe dans le sang circulant des patients des lymphocytes spécifiques de déterminants antigéniques du GBM. Ceci a été montré *in vitro* pour 5 patients ayant un GBM pour lesquels il a été possible d'obtenir une activation de lymphocytes CD8+ en réponse à la lignée de GBMU118. Ces lymphocytes avaient été activés contre des antigènes communs à la lignée tumorale et la tumeur autologue (188). Enfin, la présence de lymphocytes infiltrants la tumeur (tumour infiltrating lymphocyte en anglais TIL) a été retrouvée chez des patients longs survivants (189-192).

1.2.3.1.2. L'immunothérapie : une thérapie envisageable pour le GBM ?

La plupart des essais thérapeutiques d'immunothérapie dans les gliomes malins n'ont pas pour le moment permis d'obtenir de bénéfice clinique pour la majorité des patients. Nous avons rapporté dans une revue de la littérature les essais thérapeutiques d'immunothérapie utilisant des lymphocytes tueurs activés (lymphocyte-activated killer en anglais LAK), LT cytotoxiques, TIL, cellules tumorales autologues et cellules dendritiques dans les gliomes de haut grade publiés durant les 25 dernières années (193). Nous avons discuté l'efficacité et les limites de ces différents essais de phases I/II. Cette approche prometteuse d'immunothérapie pourrait être plus efficiente en cas de meilleure caractérisation de la cible et des agents d'immunomodulation impliqués.

ARTICLE N°3: (193)

Overview of cellular immunotherapy for patients with glioblastoma.

Vauleon E, Avril T, Collet B, Mosser J, Quillien V.

Clin Dev Immunol. 2010 ; 2010. pii : 689171.

Savoir que les cellules immunes peuvent être soit une cible potentielle soit des effecteurs de l'immunothérapie et de l'immunomodulation a permis de nombreuses avancées thérapeutiques récentes. Hsu a rapporté le premier essai de vaccination avec des cellules dendritiques dans le lymphome B folliculaire (194) et Yu le premier essai dans les gliomes malins (195). Récemment, dans le cancer de la prostate métastatique résistant à la castration, le sipulucel-T a obtenu son autorisation de mise sur le marché aux Etats-Unis (196).

De plus, l'immunomodulation est actuellement une voie thérapeutique innovante notamment dans la prise en charge du mélanome localement avancé et métastatique. En effet, les deux essais de phase III publiés en 2011 utilisant l'ipilimumab, anticorps anti-CTLA4, ont permis d'obtenir une différence de survie globale (197;198). Cet anticorps associé à une chimiothérapie standard permet de reverser la tolérance immune des cellules mélanomateuses. La tolérance est correcte avec uniquement des effets secondaires auto-immuns avec une prise en charge maintenant codifiée. Aucune autre thérapeutique anticancéreuse n'avait pu obtenir ce résultat significatif de différence de survie depuis plus de 15 ans dans la prise en charge du mélanome métastatique.

Les propriétés qu'ont les tumeurs de se soustraire au système immunitaire ont d'ailleurs été ajoutées dans les « hallmarks of cancer : the next generation » mis à jour en mars 2011 par Hanahan et Weinberg (199) (Cf. Figure 6).

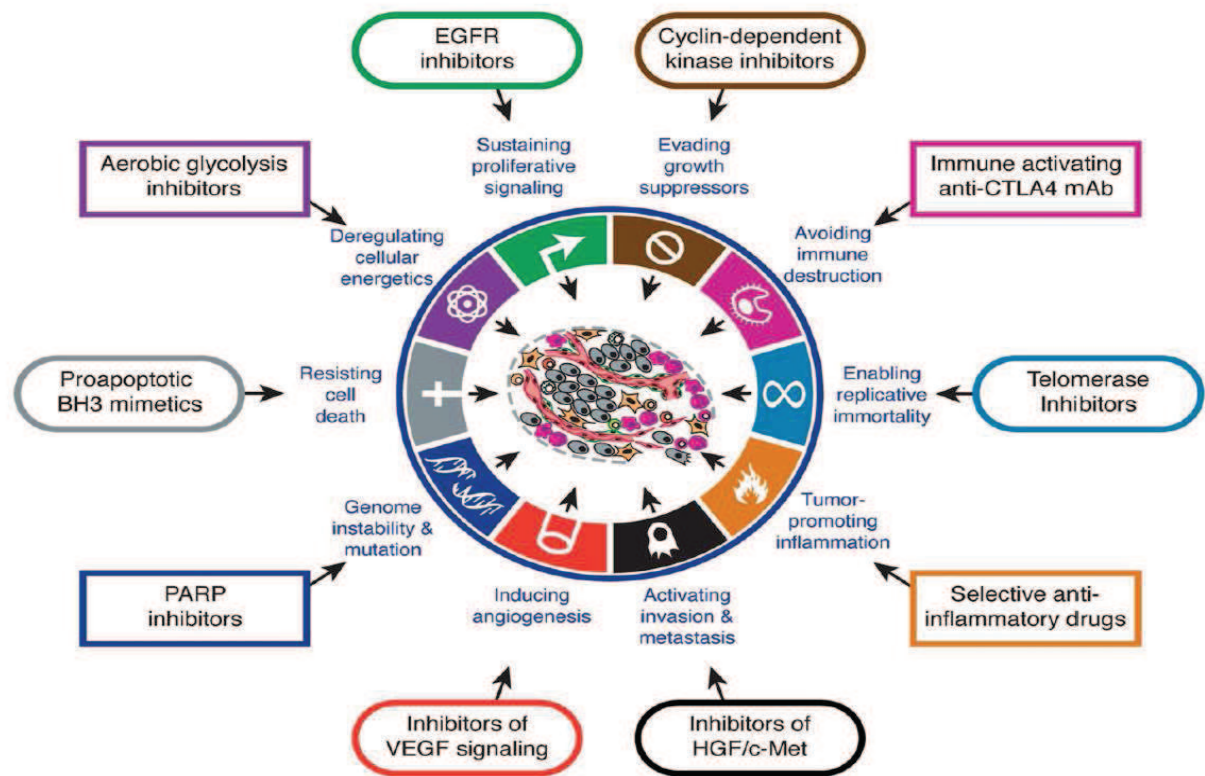


Figure 6 : “Hallmarks of cancer : the next generation”(199).

Ce schéma représente la mise à jour de l'ensemble des propriétés des cellules cancéreuses et des principales thérapies ciblées correspondantes. Les cellules cancéreuses étaient caractérisées par 6 fonctions : l'indépendance vis à vis des facteurs inhibiteurs de croissance, l'activation de l'invasion et des métastases, l'immortalité, l'induction de l'angiogenèse, la résistance à la mort cellulaire et la prolifération (hanahan 2000). De nouvelles cibles thérapeutiques potentielles et l'exemple le plus connu de la biothérapie correspondante ont été ajoutés avec notamment l'utilisation d'inhibiteur de cycline dépendante kinase, de l'activation de la réponse immune via un anticorps anti-CTLA4, de l'utilisation d'inhibiteur de télomérase, de drogue anti-inflammatoire, d'inhibiteur de c-MET et HGF, d'inhibiteur de proapoptotique BH3, d'inhibiteur de la glycolyse aérobie, d'inhibiteur de VEGF, d'inhibiteur de PARP, et d'inhibiteur d'EGFR par exemple.

L'immunothérapie et l'immunomodulation sont ainsi toujours en cours de développement en cancérologie, avec des résultats récents prometteurs. A l'ASCO en 2012, l'anticorps anti-PD-1 (programmed-death 1 en anglais) a été étudié en phase I dans de multiples localisations néoplasiques. Cette thérapie ciblant à nouveau un gène d'immunomodulation semble prometteuse. De plus, aucune réponse n'a été obtenue chez les patients dont la tumeur n'exprimait pas le ligand PD-L1 en IHC. Donc, non seulement l'anticorps anti-PD-1 induit un bénéfice clinique mais il existe également un facteur prédictif de réponse (200).

En neuro-oncologie, l'ipilimumab a permis l'obtention de réponses au niveau des métastases cérébrales de mélanomes et l'anticorps anti-PD-1 dans quelques cas de GBM en phase I. De prochains essais vont probablement étudier ces thérapeutiques dans les gliomes de haut grade.

Nous nous sommes donc intéressés aux gènes immuns pour connaître les plus impliqués dans la gliomagenèse et les plus liés à la survie des patients.

1.2.3.2. Gènes immuns

De récentes études transcriptomiques ont rapporté des signatures immunes dans les profils d'expression des gènes dans les gliomes (166;201-203) et dans le GBM (204-209).

Nous avons rapporté les différentes études sous forme d'un tableau avec le nombre, le type d'échantillons analysés et les gènes retrouvés, dont l'impact pronostique est indiqué dans la dernière colonne quand il existe (Cf. Tableau 2).

Les gènes immuns retrouvés dans les différentes études sont rapportés par certains auteurs comme appartenant à des signatures immunes différentes : des signatures générales de type réponse immune (147;166;190;201-203;205;209-211), signature cytokinique (147;166;201;212-217), présentation via les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de type II (201;203;214), ou des signatures cellulaires plus précises de type macrophagique-microgliale (190;201;206;208;209;211), lymphocytaire (203;206;212;217) plus spécifiquement T (147;190;202-204;210;217;218), B (147;201;203;204;213;217), granulocytaire (147;202;203;217) ou NK (201;210;217).

Références	Tumeurs	Gènes différentiels dans GBM /gènes immuns et Clusters	Fonctions immunes	Lien survie
Sallinen (219)	GBM gliomes	40 surexprimés/11 immuns: TNFR1, 2, TGF induced genes, LIF, MIF, Nexin, VEGF, HBNF-1, IGFBP2 3 5 et 6 10 sous-exprimés/1 immun: TIAM1		
Rickman (168)	21 GBM 19 I	167 surexprimés/4 immuns: LY6E, TGFB1, CD24, IGFBP2 193 sous-exprimés/8 immuns: KLRC3 et 1, CD59, SCYA4, SCYA3, IL1B, Nexin PN1, CD56/NCAM1		
Kim (220)	10 GBM 15 gliomes	11 gènes/4 immuns: TNFSF5, CXCR4, CCR2, IGFBP2		
Nutt (167)	28 GBM 22 OIII	10 surexprimés/1 immun: CD74 associés aux Ag CMHII 10 sous-exprimés/ 3 immuns: RPS13, RPL24, RPS20		
Godard (201)	27 GBM dont 18 de <i>novo</i> 4 II	1 Cluster G12: 13 immuns surexprimés dans GBM: IGHG3, FCGR1A/CD64, FCGR3A/CD16 IFITM1/CD225, CYBB, MX1 CD74, HLA-DRA AIF1, TYROBP/DAP12, GSTTLp28, ARHGAP4,	signature immune Ig et récepteurs Fc régulation par IFN γ présentation CMH II signature macrophage et NK	oui
Mischel (214)	13 GBM CD14, HLA-DQB1, DRB1, DEA, DPB1, DPA1 IFI30, RPL41, SCYA2, CD99, MAG	90 gènes / 11 immuns :	présentation CMH II régulation par IFN γ extravasation/ migration leucocytes	
Freije (221)	50 GBM 24 III	44 gènes/ 8 immuns : MAL2, IGF2, IGFBP 2, 4 et 6, LIF, VEGF, GDF8		

Références	Tumeurs	Gènes différentiels dans GBM /gènes immuns et Clusters	Fonctions immunes	Lien survie
Hoelzinger (222)	13 GBM	59 surexprimés/ 5 immuns : SPARC, HLA-DRA, MAL, EGFR, FGFR3 60 sous-exprimés / 11 immuns : MTCP1, CD163, CD68, IFI116, MNDA SERPIN, SERPINH2, IGFBP2 et 5, VEGF, VCAM1		
Liang (206)	29 GBM 3 cerveaux N	cluster de 35 gènes : cellules immunes CD53, CD68, CD44, CMH II CD4, CMH II CSF1R, FPR1, TNFAIP3, A2M, IL1R1, TGFB1, CXCL9, CMH I, TLR2, CD86, SLA, FCGR3A, AIF1, IL10RA, FCGR2A/B, C1 R/S, C1 QA/QB/QG, CAPG, SYK, TGFB2, Cathepsin H, MAFB, LTF, SOCS3, TGFB2, B2M, VCAM1, CSF1, IL13RA1, FCGRT	macrophages+/- activés, microglie, lymphocytes	
Rich (215)	41 GBM	osteonectin/SPARC, surexpression 3 gènes : SPARC, doublecortin, semaphorin3B	réponse stimuli cytokines	oui
Phillips (164)	76 III IV	26 surexprimés lors récidive mésenchymateuse/ 10 immuns : HLA-G, SERPINE1, SERPING1, CD44, TIMP1, TNFRSF12A, CD59 IL4, FOXP3, TGFB1		oui
Tso (209)	60 GBM dont 46 de <i>novo</i> 32 gliomes	SERPINE1A, SERPINA3, SERPINE1, IGFBP2, PTX3, C5R1, FCGR3B, CEBPD, TIMP1 TGVB1, TAGLN, IL8, PBEF, EGFR, LTF CCL, CD14, CD163, STAB1, Z391G, LYZ, IFI30	réponse immune TAM	
Horvath (205)	55 GBM 65 GBM 77 cancers sein	1 cluster de 606 gènes de réponse immune retrouvé dans 2 cohortes de GBM	réponse immune	
Persson (223)	28 GBM 4 cerveaux N	31 surexprimés/ 6 immuns: CD44, CD99, HLA-C, CKLFS6, CKLF, IGFBP3		

Références	Tumeurs	Gènes différentiels dans GBM /gènes immuns et Clusters	Fonctions immunes	Lien survie
Shirahata (203)	20 GBM 12 OIII	81 surexprimés/ 13 immuns : IFITM3, IFI30, IGFBP2, CD14, CD63, TYROBP, CD99, LR8, FN14, CD74, CD44, MCP1, PAI1/Nexin	enrichissement biologique: 2-présentation Ag CMH II 6-réponse immune 2-réponse immune humorale 1-sélection cellules T 1-sélection thymique positive cellules T 1-sélection thymique négative cellules T 1-différenciation cellules T 1-différenciation lymphocytaire 1-réponse immune médiée par Ig 1-différenciation granulocytaire	
Lee (165)	267 GBM	GBM mésenchymateux: SERPING1, SERPINIF1, SERPINIA3 et 1, IFI30, TGFB1, IGFBP 2, 4 et 6, TIMP1, CD14, Nexin, CD54, TNFA13, IL8, IL1R1, TGFBIF, CD32, CD163, CD16 a et b, TCGIRG1, BCLL, CD58, IL1R2, IL13RA2, TNFAI8, CXCL2 et 14, VEGFA, CXCR4, TMSB10, GDF15		
Murat (208)	80 GBM	Cluster G24 : 134 sondes ITGB2, CD53, PTPRC FCER1G, CTSC, CTSS, C1QB, F13A1, CD163, STAB1, ALOX5AP, FCER1G, MRC1, ALOX5, TGFB2, MSR1, C1QA, CLEC7A, C1QC CD14, TYROBP, TLR1, C3, TLR7, HAMP, TLR8 Cluster G12 : 80 sondes Cluster G14 : 26 sondes	réponse immune innée, macrophage, M2 macrophage macrophage polarise M2 immunité innée (G24) gènes induits par IFN lignées myéloïdes	
Marko (207)	20 GBM 7 OS> 2 ans 13 OS< 9 mois	43 gènes/ 9 immuns : CD34, FCRL5, IGHG1, IL13RA1, IL17, IL22, SERPING1, RPL10 et 41.		oui

Références	Tumeurs	Gènes différentiels dans GBM /gènes immuns et Clusters	Fonctions immunes	Lien survie
Parsons (153)	22 GBM	685 mutations, 147 amplifications, 134 délétions 42 gènes candidats/ 1 immun : SERPINA12		
Reddy (224)	71 GBM dont 45 de <i>novo</i>	surexpression: GADD45A, FSTL1, surexpression dans GBM de novo : SOD2, AEBP1		oui
Zhang (217)	III IV tumeurs solides	1 cluster de réponse immune : IFNGR1, PCNA, PTTG1, RAC2, RPA3, UNG		
	118 GBM	124 gènes/ 39 immuns : IL10, IFNA et IFNG, récepteur KIT, TNFR1, CCR5, TNFRSF1A, IL3RA, PDGFRA, IL13RA2, TGFRABP1, TIAM1, IFNGR1, IFNAR2, CTSS, IL11, FLT1, TGFB1, BCL2L1, CCR1, IFITM1, HLA-DRB1, HLA-DRA, CD19, CD79A/B, SERPINA3, TNFRSF8, CD72, CD14, TLR7, CCL4, CXCR4, C3, CCR3, IFRD1, CD33, HLA-A, TNFRSF11A, ACVR2A	fonctions immunes rapportées : cytokines et récepteurs lymphocytes B T NK éosinophiles réponse immune réponse cellulaire de défense réponse immune T helper 1 réponse aux agents microbiologiques	
Gravendeel (166)	159 GBM 117 gliomes	cluster 23 catégorie fonction M	réponse immune cytokines IFNA, TGFB, TNF	oui
Li (218)	69 GBM 67 gliomes	cluster G enrichis en gènes immuns, comprend 55 des 69 GBM	signature T, B, innée cytokines: TNF, TGF, IL1, 10, 22, 4, 6	
Xu (216)	13 GBM 8 III	surexpression : SERPINE1/PAI-1, FN1 THBS1, COL4A1, COL1A2, LTBP2, ITGB5	activation hétérogène cytokine TGFβ	
Cluster de réponse forte au TGFβ: 100% GBM du jeu d'entraînement 59% et 67% des jeux de validation				

Références	Tumeurs	Gènes différentiels dans GBM /gènes immuns et Clusters	Fonctions immunes	Lien survie
Shirahata (225)	100 GBM 52 gliomes	37 surexprimés/ 9 immuns : FN14, TIMP1, IGFBP2, CD63, IFITM3, TMSBAX, TMSB10, IGFBP3, IFI30 21 surexprimés dans gliomes, aucun immuns		oui
Ivliev (202)	276 gliomes	module M7 GBM: 499 gènes dont CD4 CD8 et CMH II TLR1 et 2 module M2 GBM : 50 gènes dont IFI35, IFI44, IRF7, IRF9, MX1	réponse immune signature T signature myéloïde, innée	oui
Ducray (204)	67 GBM 21 répondeurs à RT 18 non répondeurs 11 rép à 1 ^{ère} ligne CT 17 non répondeurs	20 gènes les plus surexprimés Cluster G24 20 gènes/6 immuns: CXCL2, HLA-DQB1, MPEG1, ERAP2, TLR7, CD74 20 gènes/3 immuns: IL8, MEOX2, VEGFA 20 gènes/3 immuns: HLA-DRB4, FGFR3, AIF1L 20 gènes/3 immuns: KLRC1, CXCL12, RPS11	réponse immune B et T	
Garcia (226)	8 GBM	19 surexprimés GBM133+/ 1 immun: TGGB1 22 sous-exprimés GBM133+/ 4 immuns: RPS19, RPS18, PPSA15, RPL13A		
Verhaak (147)	173 GBM mesenchymateux	cluster système immun STAT6, TLR4, FCGR2A, LCP2, MAFB, SLC11A1, PTGER4, PROCR, LAIR1, IFI30, CD4, ITGB2, TLR2, CTSC, CASP8, ELF4, IL1R1, PTPRC, MYH9, NCF4, ITGAM, TNFRSF11A, SWAP70, PTPN22, FCGR2B, LY96, LY75, LILRB2, RELB, HFE, LILRB3, IL4R, TIMP1, C5AR1, CLCF1, CD14, TNFRSF1B, TNFRSF1A	enrichissement fonctionnel: réponse immune réponse innée activation différenciation leucocytaire cytokines, chimiokines activation lymphocytaire, Ig différenciation myéloïde activation lymphocytaire T, B	

Références	Tumeurs	Gènes différentiels dans GBM /gènes immuns et Clusters	Fonctions immunes	Lien survie
Chang (210)	133 gliomes INFG, TGFB1, cytokines, IL1B	6 gènes / co-expression	réponse immune signalisation NK et activation T	
Duarte (227)	173 GBM	8 immuns IFN/STAT1: STAT1, MX1, IFIT1, IFI44, IFIT3, OAS1, ISG15, USP8		oui
Cooper (228)	91 GBM 293 GBM	mesenchymateux surexpression C/EBP-β et δ, STAT3 FOSL2, RUNX1, bHLHE40 co-expression C/EBP-β lié à IL8, C/EBP-δ lié à IL6		oui
Donson (190)	84 GBM 2 III 63 GBM 6 III	1106 gènes corrélés à la survie /205 immuns dont CD3D, E et G, CD8B, TRAC, TRAT1, VAV1, ZAP70 AIF1, CD68, CD86, CIITA, HLA-DOA, DQB2, DRB1 et DRB6, NOD TLR 2, 3,5, 6,7 et 8 IL10	signature T signature microglie macrophage, réponse immune innée	oui
Engler (211)	173 GBM mésenchymateux	12 gènes immuns 48% enrichis en gènes réponse immune	réponse immune/activation lymphocytes réponse immune adaptative et aux infections et blessures	
		CCL8, SPP1, IRF7, IL1RAP IL1RN, IL1RAP, SSP2, PDRN, MDK, TFRC, HRH4 IL6, SSP1 IL6, SSP1, CCL8, MDK	microglie macrophage TAM recrutement monocytes microglie	
		signature immune macrophage monocytes et granulocytes (- 6 vs + 24 mois)		oui
	53 gliomes III IV enfants mésenchymateux	28% enrichis en gènes réponse immune notamment en gènes de microglie, macrophage, monocytes, et négativement en gènes de NK, érythrocytes nucléés		

Tableau 2 : gènes immuns rapportés dans la littérature.

La référence bibliographique est décrite dans la 1^{ère} colonne, le type de tumeur (grade, nombre) dans la 2^{ème} colonne, les gènes immuns et clusters dans la 3^{ème} colonne ainsi que leur fonction ou signature dans la 4^{ème} colonne. Si une association à la survie est retrouvée, elle est rapportée dans la dernière colonne.

Nous allons nous attarder dans ce paragraphe sur les gènes immuns impliqués dans les gliomes de haut grade les plus rapportés dans la littérature c'est-à-dire par ordre décroissant *IGFBP2*, *SERPIN1/NEXIN*, *CD14*, *IFI30*, *CD44*.

Le gène *IGFBP2*, codant pour la protéine 2 de liaison du facteur de croissance apparenté à l'insuline (insulin-like growth factor-binding protein 2 en anglais) (229), a été rapporté dans 9 études (165;203;209;220-222;225). Les autres gènes de la même famille ont été également retrouvés dans 3 études pour *IGFBP3* (217;219;223), dans 2 études pour *IGFBP6* (165;219) et dans une seule étude pour *IGFBP5* (219). *IGFBP2* est un gène qui est surexprimé dans les cancers de la prostate (230), ovarien (231), mammaire (232), colique (233) et dans 80 % des GBM et 20% des gliomes anaplasiques (234) entre autres. Il est fortement exprimé dans les cellules astrogliales fœtales puis son expression dans l'astroglie diminue après la naissance suggérant que la progression des gliomes est due à une dédifférenciation ou un blocage de différenciation (234;235). Ce gène est surexprimé dans les gliomes de haut grade notamment dans les GBM (168;203;209;219-221;225) par rapport aux gliomes de bas grade et anaplasiques. Le taux sérique d'IGFBP2 est corrélé au grade des gliomes dans une étude (236), il est plus élevé en préopératoire chez les patients ayant un gliome de haut grade sans effet de l'âge, du sexe, de l'indice KPS préopératoire dans une autre (237). Il est corrélé à la SSP des patients pris en charge pour un GBM dans cette étude (237) et la surexpression du gène est corrélée à une survie péjorative dans 4 autres études (203;225;238;239). MacDonald et *al.* ont montré notamment que le sous-groupe de GBM n'exprimant ni IGFBP2 ni IQGAP1 avait une survie plus longue de plus de 3 ans (239). Hsieh et *al.* ont montré que la surexpression d'IGFBP2 est présente dans les cellules souches gliales, son inhibition est responsable de la diminution de résistance aux traitements de ces cellules souches gliales *in vitro* (238).

La première fonction décrite est celle de se lier au facteur de croissance de l'insuline (insulin growth factor en anglais IGF 1 et 2) par son motif spécifique (IGF-binding en anglais) et d'inhiber la croissance cellulaire (240) en séquestrant IGF 2 et empêchant ainsi son interaction avec son récepteur. Cependant de récentes études ont montré que l'IGFBP2 a pour fonction de favoriser la croissance cellulaire et la tumorigénicité de certains cancers (241;242). IGFBP2 est impliqué dans la croissance cellulaire via la voie de signalisation AKT/PI3K (243;244). Mehraïn-Shai et *al.* ont montré que l'expression d'IGFBP2 est négativement régulée par PTEN (244). *In vitro*, p16^{INK4a} inhibe la fonction oncogénique d'IGFBP2 dans des lignées de gliomes ainsi que dans 90 lignées de cancers. En cas de délétion de p16^{INK4a}, il semblerait intéressant d'inhiber l'expression d'IGFBP2 comme dans le modèle murin décrit par Moore et *al.* (245). Non seulement IGFBP2 active la voie AKT mais il collabore avec K-Ras ou PDGFB dans le développement astrocytaire et oligodendrogial respectivement et dans la progression tumorale de ces deux types de gliomes (243).

Il intervient également dans l'invasion cellulaire via des interactions avec les métalloprotéases notamment MMP-2 (matrix métalloprotéase 2 en anglais MMP-2) (246), les intégrines $\alpha 5$ *in vitro* (247;248), $\beta 1$ (249), les kinases liées aux intégrines (intégrin-linked kinase en anglais ILK) (248;250;251). Notamment Rorive et *al.* ont montré que MMP-9 protéolyse le complexe formé par IGFBP2-IGF 2 *in vitro* libérant l'IGF 2, favorisant ainsi non seulement la croissance des cellules astrocytaires LN229 mais également leur motilité (252).

Du point de vue immunitaire, les cellules microgliales macrophagiques CD68+ infiltrant la tumeur expriment IGFBP2 dans le modèle de rat C6 GBM (253). Ce gène est un facteur de croissance qui favorise également la prolifération des cellules mononucléées du sang périphérique et leur activation par l'anticorps anti-CD3 (254). IGFBP2 est immunogène dans le cancer du sein : des anticorps IgG spécifiques d'IGFBP2 sont détectés dans le sang de patientes traitées pour un cancer du sein comparativement aux témoins (255). La majorité des peptides d'IGFBP2

présentés par des molécules de classe II sont reconnus par des cellules T humaines. Dans un modèle de souris, la vaccination à base de 3 peptides d'IGFBP2, épitopes humains immunogènes chez la souris, inhibe la croissance cellulaire de 50% par rapport aux contrôles (255). Dans le GBM, Dutoit et *al.* ont recherché des antigènes spécifiques des GBM en étudiant l'élution des peptides liés aux molécules du CMH de classe I, à partir de 32 tumeurs de GBM HLA-A02. Plus de 3000 peptides restreints HLA-A2 ont ainsi été mis en évidence, dont 309 dérivés de gènes surexprimés dans les GBM par rapport au cerveau normal. Parmi ces 309 peptides, les auteurs en ont retenu 35 impliqués dans des voies de signalisations oncogéniques de prolifération et d'invasion, dont 10 sont immunogènes, notamment un gène de cette grande famille : *IGF2BP3* (256). Le vaccin IMA-950, comportant ces 10 peptides immunogènes, est actuellement étudié en phase I/II aux Etats-Unis (NCT01403285). Une étude a rapporté que ce gène *IGF2BP3*, qui module également le taux de la protéine IGF 2, peut être considéré comme un marqueur de prolifération et d'invasion dans le GBM (257).

La famille des gènes appelés SERPIN ou inhibiteurs de sérine protéase a été retrouvée dans de nombreuses études dans le GBM (153;164;165;168;203;207;209;216;217;219;222). Ces gènes sont connus pour intervenir dans les processus biologiques tels que la coagulation, l'apoptose et l'inflammation (258;259).

SERPINE 1 ou l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (plasminogen activator inhibitor 1 en anglais PAI-1) correspond comme son nom l'indique à un médiateur important de la coagulation grâce à l'inhibition de l'urokinase activatrice du plasminogène (urokinase-type plasminogen activator en anglais uPA) et l'activateur tissulaire du plasminogène (tissue-type plasminogen activator en anglais tPA). Il intervient dans la migration et l'invasion cellulaire au niveau tumoral. En effet, PAI-1 bloque les interactions entre les intégrines et le récepteur d'uPA, induisant la dégradation de la matrice extracellulaire, qui libère des facteurs de croissance et des facteurs angiogéniques (260-262).

SERPINB3 ou SCCA1 a été également étudié en oncologie. Il est rapporté comme un facteur pronostique indépendant dans une série rétrospective de 296 patientes traitées par anthracycline plus ou moins docétaxel en séquentiel pour un cancer du sein. La positivité de SERPINB3 en IHC est associée à une survie plus courte des patientes si elles ont été traitées par anthracycline seule par rapport à celles traitées par anthracycline et docétaxel ou SERPINB3 négative (263). Une expression forte de la protéine SERPINB3 a été également rapportée dans le cancer de l'ovaire résistant au platine (264), et elle est associée à une SSP plus courte. Dans les cancers bronchopulmonaires non à petites cellules traités par des chimiothérapies à base de platine, l'expression de SERPINB3 est corrélée négativement à la réponse clinique (265).

Dans le GBM, les gènes de la famille des SERPIN semblent surexprimés dans la plupart des études à l'exception de 2 études où le (s) gène (s) *Nexin* (168), *SERPIN* et *SERTPINH2* (222) sont retrouvés sous-exprimés dans les GBM. Les gènes les plus fréquemment rapportés sont *Nexin* ou *PAI-1* ou *SERPINE1* dans 6 études (164;165;168;203;209;219), *SERPING1* dans 3 études (164;165;207) dont une met en évidence un impact pronostique positif (207). Un taux sérique de SERPIN/NEXIN/PAI-1 est plus élevé chez les patients ayant un gliome de haut grade par rapport à ceux ayant un gliome de bas grade; un taux bas chez un patient ayant un haut grade est associé à une survie plus longue dans une étude (266). Une concentration élevée de SERPIN a été également mise en évidence dans les cellules de GBM résistantes au cisplatine *in vitro* (267). L'expression a été rapportée comme plus élevée dans les GBM que dans les autres grades dans 2 autres études (216;268) et elle serait également associée à la survie dans une autre (269). En IHC, la localisation de PAI-1 est proche des vaisseaux et des zones nécrotiques palissadiques (269;270) et stimulerait l'expression de VEGF *in vitro* (271). Dans le GBM, il a été mis en évidence que l'expression de SERPINE1 est régulée par TGFβ (272), notamment au niveau du promoteur du gène *SERPINE1* (273;274). Les cytokines telles

que le facteur de nécrose tumorale α (tumor necrosis factor α en anglais TNF α) et TGF β , qui sont également rapportés différentiellement exprimés dans le GBM, favorisent l'induction de l'expression de PAI-1 dans les astrocytes (275;276). Les chimiokines telles que CXCL12 seule ou avec TNF α et TGF β , augmentent également l'expression de PAI-1 dans les astrocytes exprimant la chimiokine de type C-X-C 4 (CXCR4+) via la voie ERK ou MAPK (277). La voie de signalisation CXCL12/CXCR4 intervient ainsi dans l'invasion et l'angiogenèse tumorale des gliomes via l'expression de PAI-1 (277).

Du point de vue immun, de récentes études ont montré l'implication des SERPIN dans le système immunitaire (278;279). En effet, des altérations des SERPIN notamment SERPINB3 ont été rapportées chez les patients présentant des maladies auto-immunes (278;279). Récemment un modèle murin déficient en SERPINB1 a montré une susceptibilité plus élevée d'infections suite à la mort cellulaire programmée de neutrophiles matures (278). Le gène *SERPIN1*, surexprimé dans le GBM, code pour une protéine C1 inhibiteur esterase, qui peut intervenir dans la réponse immunitaire innée et notamment dans la prévention du sepsis (280).

CD14 est le 3^{ème} gène immunitaire le plus fréquemment rapporté dans le glioblastome dans la littérature (147;165;203;208;209;214;217). D'autres gènes exprimés par les monocytes et les macrophages sont également fréquemment rapportés dans la littérature, comme par exemple les clusters de différenciation *CD163* et *CD68* rapportés dans 4 (165;208;209;222) et 3 études (190;206;222). *CD14* code pour deux protéines, une forme soluble sécrétée par les monocytes et les hépatocytes et une forme ancrée dans la membrane (281;282). *CD14* est exprimé principalement par les macrophages, et moins fréquemment par les neutrophiles et les cellules dendritiques (281;283). La protéine *CD14* intervient dans l'immunité innée, elle forme un complexe avec les récepteurs de type toll 4 (Toll-like receptor en anglais TLR4) et le co-récepteur membranaire MD2 (284;285) pour détecter notamment le liposaccharide bactérien

(LPS). Le CD14 est également capable de favoriser la formation du complexe tertiaire TLR1-TLR2-Pam3-CSK4 en réponse aux infections microbiennes (286). Le dosage sérique du CD14 soluble a été étudié dans une cohorte de 1079 patients ayant un gliome et 736 volontaires sains. Le gliome est associé à un taux élevé de CD14 soluble (OR=3,94 (95% CI : 2,98-5,21)) notamment chez les patients ayant un GBM (54). Le CD14 est capable d'inhiber l'activation et la prolifération lymphocytaire T, dans un système *in vitro* de stimulation, via une interaction directe avec les lymphocytes ou via une inhibition de production d'IL2. Le CD14 soluble peut également entraîner une diminution de production d'interféron γ (IFN γ) et d'interleukine 4 (IL4) (58). CD14 soluble peut par ailleurs réprimer le développement des lymphocytes B et réduire la production d'IgE. De récentes études dans le cancer ovarien et pancréatique montre que les anticorps IgE peuvent avoir une activité antitumorale par cytotoxicité dépendante des anticorps (antibody-dependent cellular cytotoxicity en anglais ADCC) (287;288).

Les TLR sont exprimés entre autres à la surface des macrophages et des cellules dendritiques et ils ont comme principale fonction la reconnaissance des éléments pathogènes et l'activation de l'immunité. Récemment, l'implication de la famille des TLR a été décrite dans la progression tumorale et la résistance à la chimiothérapie (289). Dans les gliomes, le gène codant TLR2 est trouvé différenciellement exprimé dans 4 études (147;190;202;206), TLR1 dans 3 études (202;208), TLR7 dans 3 études (190;204;217), TLR8 dans 2 études (190;208), et TLR3, 5 et 6 dans une étude (190). Dans le GBM, un niveau plus élevé de TLR4 a été rapporté versus le tissu cérébral normal (290). Le TNF α augmente l'expression de TLR4 dans les cellules gliales et active *in vitro* deux voies de signalisation via l'axe TLR4-AKT et HIF-1 α et via l'axe TLR4-NF κ B (290). Dans un modèle murin de xénogreffe de GBM, l'injection de LPS permet une réduction tumorale. Cette injection induit une infiltration première de neutrophiles puis de macrophages, sans expression de TLR4 et CD14 au niveau des cellules

de GBM. L'effet antitumoral du LPS, via TLR4 serait médié non pas par les cellules gliomateuses mais par la microglie et d'autres cellules inflammatoires (291).

Le TLR9 est exprimé au niveau des cellules macrophagiques, microgliales au niveau du GBM (292). Les oligonucléotides riches en CpG (CpG-ODN) induisent la sous-expression de TLR9 et l'apoptose des cellules de GBM *in vitro* et *in vivo*. La stimulation par des CpG favorise la présentation des antigènes par la microglie, la réponse immune T CD8+ et diminue le nombre de lymphocytes T régulateurs (LTreg) (293). Une phase II a étudié l'efficacité de l'administration de CpG-ODN (CpG-28) localement chez 34 patients présentant un GBM récidivant (294). L'administration de CpG-28 est bien tolérée et la SSP à 6 mois est de 19%, avec 8 patients vivants 1 an après l'inclusion et 5 à 2 ans. Une infiltration importante du GBM par les cellules immunes avec une expression forte de TLR9 pourrait être un moyen de sélectionner des patients qui bénéficieraient le plus de cette approche thérapeutique.

Les gènes codant pour l'IFN ou régulés par l'IFN sont également différenciellement exprimés dans le GBM : notamment *IFI30* dans 6 études (147;165;203;209;214;225), *AIFI* dans 3 études (190;201;206), *IFITM3* (203;217), *IFNG* (210;217), *MX1* (201;227) dans 2 études, *IFN9-27* (212), *IFI44* (227), *IFI116* (222), *IFITM1* (217), *IFIT3* (227), *IFNGR1* (217), *IFNA* (217), *IFNAR2* (217) dans une étude. La famille des IFN est constituée de polypeptides sécrétés, qui sont classés chez l'homme en 3 groupes : IFN de type I (IFN α/β) qui se lie au récepteur d'IFN α (IFNAR) et dont la fonction principale est la défense de l'organisme contre les virus ; IFN de type II (IFN γ), produit par les cellules immunes, qui se lie aux récepteurs d'IFN γ (IFNGR) et dont la fonction principale est l'activation et la modulation de la réponse immune innée et acquise ; IFN de type III (IFN λ ou IL28 et IL29), qui ont des activités antivirales et antiprolifératives (295;296).

L'IFN active également la voie de signalisation du signal de transduction et d'activation de transcription 1 (STAT1) qui inhibe la prolifération et favorise l'apoptose (297-299), mais une activation constitutive de cette voie dans les cellules cancéreuses stimule la croissance cellulaire et la résistance à la radiothérapie et à la chimiothérapie (300-302). Cette signature IFN/STAT1 a été étudiée dans le GBM, montrant que les gènes *IFI44*, *ISG15*, *MX1*, *OAS1*, *STAT1* sont associés à la survie dans les GBM proneuraux (227). L'activation constitutive de cette voie de signalisation pourrait être une des explications de la résistance aux traitements et l'absence de bénéfice d'un traitement intensif (147).

Le gène, qui code pour la protéine 30 inductible par l'IFN γ ou l'enzyme lysosomale thiol-réductase inductible par l'IFN γ (*IFI30* ou *GILT*) est surexprimé dans le GBM. Dans les lignées de mélanome, GILT augmente les molécules HLA-DM, qui favorisent l'endocytose d'antigènes retreints au CMH II et la reconnaissance par les LT CD4+ (303;304). La famille des gènes codant pour des protéines transmembranaires induites par l'IFN telles que IFITM1, IFITM3 peut moduler l'adhésion cellulaire et influencer la différenciation cellulaire dans les cellules germinales d'un modèle murin (305).

AIF1 ou facteur inflammatoire 1 d'allogreffe (appelé également *Iba1*) est un gène également induit par l'IFN et exprimé dans les macrophages. Il joue un rôle important dans l'activité pro-inflammatoire macrophagique (306). Dans les gliomes humains, il a été rapportée une corrélation entre un grade élevé et une expression forte d'AIF1 en IHC au niveau des cellules microgliales activées (co-expression AIF1 et HLA-DR, DP, DQ) présentes dans les zones de croissance tumorale et des macrophages infiltrants (co-expression AIF1 et CD68) présents dans les zones d'infiltration tumorale importante ainsi qu'en zone périvasculaire (307).

Le gène *CD44* est retrouvé différenciellement exprimé dans 4 études (164;203;206;223). La protéine CD44 est une glycoprotéine de surface, qui présente de nombreux variants suite à divers épissages alternatifs. Elle participe avec les cytokines telles que TNF α et IL1 β à l'activation lymphocytaire, la recirculation, le homing et la réponse immunitaire (308). Elle est impliquée dans les interactions cellules-cellules, cellules-matrice extracellulaire, l'adhésion cellulaire et la migration. En effet, elle correspond à un récepteur pour l'acide hyaluronique, composant crucial de la matrice extracellulaire, et elle peut interagir avec de nombreux ligands tels que les MMP, le collagène, l'ostéopontin. Le variant d'épissage v6 de *CD44* interagit avec les MMP et des facteurs de croissance pour induire une invasion cellulaire et une inhibition de l'apoptose (309-311). Dans un modèle de xénogreffe de GBM, MMP-9 est associé à CD44 à la surface des cellules et MMP-9 est capable de cliver CD44 (312), permettant aux cellules de diffuser et d'infiltrer le tissu cérébral (313;314).

CD44 interagit également avec le récepteur à activité kinase c-Met dont le ligand est le facteur de croissance hépatocytaire (hepatocyte growth factor en anglais HGF), responsable non seulement de la migration des cellules musculaires au cours du développement de l'embryon mais également de la prolifération et de l'invasion cellulaire de cellules adénocarcinomeuses coliques humaines (315;316). Le gène *c-Met* est surexprimé ou muté dans de nombreux cancers. CD44 agit comme promoteur de tumeur dans les cellules de carcinome pancréatique où c-Met est surexprimé (317). L'interaction entre CD44 et c-Met permettrait l'activation de c-Met (316), grâce à la formation d'un complexe tertiaire CD44-c-Met-HGF, dont la partie cytoplasmique de CD44 est nécessaire pour transmettre le signal du récepteur de c-Met aux cibles cytoplasmiques.

Mais d'autres études ont montré à l'opposé que la surexpression de CD44 standard ou variant peut inhiber l'invasion et le potentiel métastatique, comme un suppresseur de tumeur notamment dans le cancer de la prostate (318;319). Le rôle suppresseur de tumeur de CD44 semble en partie lié *in vitro* à la merline, qui est le produit du gène de la neurofibromatose de type 2 (*NF2*). La protéine merline se lie à CD44 interférant avec la transduction du signal Ras/PI3K/AKT, induisant l'arrêt de la croissance cellulaire (320;321).

CD44 peut également former un complexe avec CD74, qui code la chaîne invariante associée à HLA-DR (322;323) impliquée dans la formation et le transport des protéines du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (324). Le facteur d'inhibition de la migration macrophagique (macrophage migration inhibitory factor en anglais MIF) a été identifié comme le ligand naturel de CD74, favorisant l'activation de cellules immunes telles que les monocytes/macrophages (325). MIF active les voies AKT et ERK MAPK via un complexe formé par CD74 et CXCR4 (326-328) et MIF attire les monocytes et les LT via son interaction avec les récepteurs CXCR4 et CXCR2 (329;330). RPS19, sécrété par les cellules apoptotiques (331), est capable d'inhiber l'interaction entre MIF, CD74 et CXCR2 à la surface cellulaire (332). Dans le GBM, l'accumulation de MIF dans les zones nécrotiques et la surexpression de MIF lors du stress hypoxique pourraient jouer un rôle dans la néovascularisation (333). Dans une étude de 36 gliomes de haut grade dont 20 GBM, la surexpression de MIF est corrélée à un pronostic péjoratif avec une survie sans récurrence plus courte (334). Dans une autre étude, l'expression de MIF est corrélée aux grades et l'expression de l'ARNm est 800 fois plus élevée dans les 166 gliomes versus les 23 cerveaux normaux (335). Les lignées de gliomes p53 sauvage ont une expression également plus élevée que celles mutées. Le blocage de MIF par un ARN interférant augmente la susceptibilité de lyse cytotoxique médiée par les cellules NK. MIF participerait à la tolérance immune dans les

gliomes malins via son action sur les cellules NK et CD8+ en sous-exprimant le récepteur activateur NKG2D (335).

D'autres gènes impliqués dans la matrice extracellulaire comme celui de l'inhibiteur de la MMP-1 (tissue inhibitor of MMP1 en anglais *TIMP-1*) (164;209;225) ou dans la migration des cellules leucocytaires tels que *CD99* (203;214;223), *CD74* (167;201;203;204), *CXCR4* (165;217;220), *MIF* (219) et d'autres gènes codant pour des chimiokines sont différenciellement exprimés dans le GBM.

Potentiellement d'autres gènes d'intérêt ont été rapportés dans la littérature, cependant il est difficile de mettre en évidence que l'action de ces gènes dans le GBM est liée principalement à des fonctions immunes.

1.3. Infiltration cellulaire du GBM

Après l'étude des gènes immuns différenciellement exprimés dans le GBM, nous avons souhaité étudier les cellules immunitaires impliquées dans le GBM. Après un rappel des cellules immunitaires impliquées dans la réponse immune, nous décrirons les cellules immunes infiltrant le GBM. Puis nous rapporterons les autres cellules du GBM, qui peuvent moduler les fonctions et/ou le recrutement des cellules immunitaires. Enfin, nous nous intéresserons à l'environnement immunosuppresseur du GBM.

1.3.1. Rappel sur les principales populations du système immunitaire

La finalité du système immunitaire est d'éliminer les éléments considérés comme étrangers « non soi » plus ou moins spécifiquement. La surveillance immunitaire correspond par définition à la fonction physiologique de destruction des cellules transformées ou néoplasiques par le système immunitaire non compromis (336). L'implication du système immunitaire dans la reconnaissance et l'élimination des cellules cancéreuses a été évoquée pour la première fois au XIX^{ème} siècle par Coley devant la régression spontanée de tumeurs dans un contexte infectieux (337).

Les cellules immunitaires impliquées dans la réponse antitumorale ont été étudiées, leurs interactions sont schématisées ci-dessous (Cf. Figure 7).

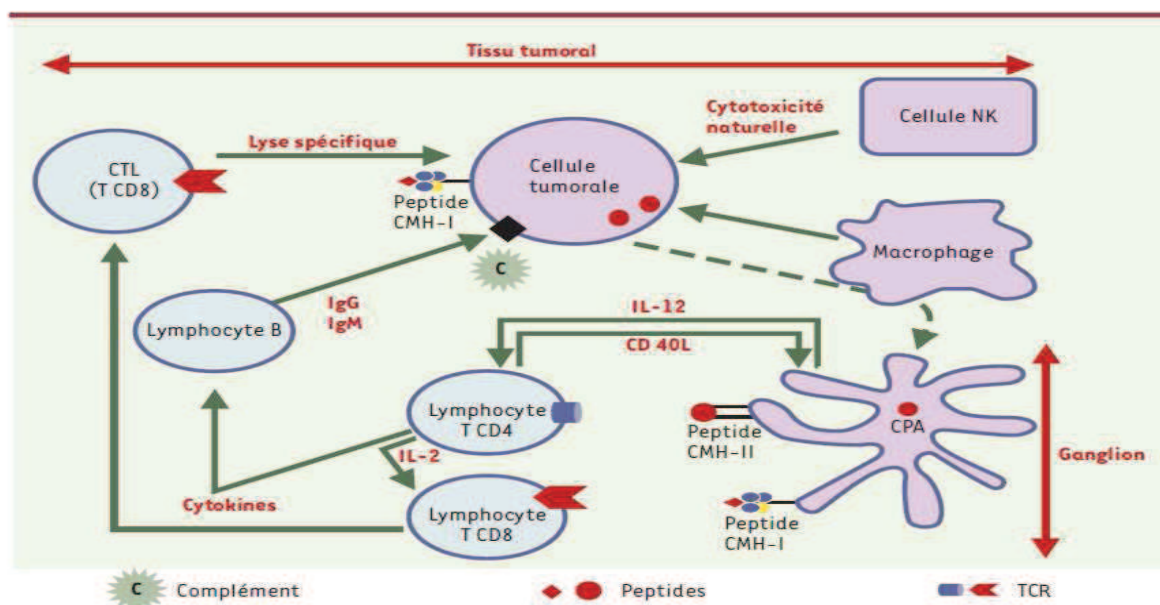


Figure 7 : schéma de la réponse immunitaire antitumorale (innée et acquise) (338).

Les cellules tumorales sont détruites via une réponse innée médiée par les cellules NK et macrophages, mais également via une réponse immunitaire acquise passant par la présentation des antigènes par les CPA et la coopération des LB et LT CD4⁺ et CD8⁺ amenant la lyse spécifique par les lymphocytes cytotoxiques.

(CTL : lymphocyte T cytotoxique, CPA : cellule présentatrice d'antigènes, NK : cellule natural killer, CMH : complexe majeur d'histocompatibilité, TCR : récepteur cellulaire du lymphocyte T).

La réponse immunitaire dite innée élimine les agents pathogènes sans reconnaissance spécifique. Elle correspond au premier rempart de défense de l'organisme vis-à-vis des cellules cancéreuses notamment. Elle implique les cellules tueuses (natural killer en anglais NK), les lymphocytes NKT (capables de sécréter l'IL2 et l'IFN γ , qui interagissent avec les cellules NK et les LT CD8+), les lymphocytes T $\gamma\delta$ (ayant des TCR et des récepteurs activateurs de lyse comme par exemple NKG2D, CD160, et KIR2DS) et les cellules phagocytaires, notamment les macrophages qui induisent une ADCC. Elle est favorisée par la sécrétion d'immunomodulateurs tels que le TNF α , les dérivés nitrés ou radicaux libres oxygénés.

Contrairement à la réponse innée, la réponse acquise est très spécifique, lymphocyte dépendante, avec une possibilité de phénomène mémoire. Elle comporte 4 phases : reconnaissance-activation, prolifération, phase effectrice et mémoire.

Les antigènes (Ag), substances capables d'être reconnues et d'induire une réaction immune, proviennent soit de la dégradation de protéines endogènes, ils sont alors apprêtés puis présentés aux LT cytotoxiques CD8+ couplés aux molécules du CMH I; soit d'antigènes exogènes et sont présentés aux LT auxiliaires CD4+ couplés aux CMH II. Pour qu'une protéine soit immunogène, la région antigénique dite épitope doit être reconnue spécifiquement par les récepteurs cellulaires T ou B (TCR ou BCR) via une présentation par une molécule du CMH I ou II. Le concept de reconnaissance des cellules cancéreuses par le système immunitaire a été démontré par Burnet et notamment le pouvoir immunogène de certaines tumeurs (336). Les Ag tumoraux ont été mis en évidence dans le mélanome dans un premier temps, puis dans d'autres types tumoraux (339). La réponse immunitaire spécifique est non seulement CMH restreinte mais un deuxième signal de co-stimulation est nécessaire, induit par les molécules stimulatrices de type B7-1 et B7-2 sur la CPA reconnaissant le CD28 sur les lymphocytes. Ces molécules peuvent aussi interagir avec la molécule CD152 (CTLA-4 :

cytotoxique T lymphocyte antigen 4) et alors provoquer un signal inhibiteur. Les molécules B7H1 ou PD-L1 présentes sur les CPA et les cellules tumorales ont quant à elles une action inhibitrice via PD-1 sur les lymphocytes.

Les LT CD4⁺ se distinguent en fonction des profils cytokiniques Th1 et Th2 favorisant la réponse cellulaire ou humorale. La voie humorale a pour fonction d'éliminer les agents pathogènes extracellulaires et la voie cellulaire élimine les cellules du soi altérées par une infection ou une tumeur. Les lymphocytes T helper de type Th1 sont caractérisés par la production de cytokines pro-inflammatoires comme IFN γ , IL2, et TNF β . Ces cellules sont impliquées dans l'immunité cellulaire et stimulent la phagocytose et la destruction des pathogènes microbiens. Les lymphocytes T helper de type Th2 sont eux caractérisés par la production d'IL4, IL5, IL9, IL10 et IL13. Les lymphocytes CD8⁺ sont dit cytotoxiques ou (cytotoxic T lymphocytes en anglais CTL), ils sont responsables de la lyse spécifique des cellules tumorales. Les LT qui expriment CD4⁺ CD25⁺ et le facteur de transcription Scurfin mieux connu sous son appellation en anglais Forkhead box protéine P3 (FoxP3) sont dits LT régulateurs (LTreg) (340). Ces cellules sont impliquées dans l'inhibition de la réponse immune notamment après que l'organisme étranger ait été éliminé ou pour prévenir l'auto-immunité. Plusieurs études ont montré que l'infiltration de LTreg est associée à une survie plus courte (341) ou à un phénotype à risque métastatique (342) notamment dans le cancer de l'ovaire.

Les lymphocytes B sont responsables de la réponse humorale, ils sont capables de capter et de présenter un antigène. Lors de la réponse humorale, les lymphocytes B sécrètent des anticorps spécifiques. Lors de la réponse cellulaire, les antigènes sont présentés par des CPA dont les lymphocytes B en association avec des molécules de co-stimulations.

Les CPA, cellules présentatrices d'antigènes, correspondent aux macrophages, aux cellules dendritiques (dendritic cell en anglais DC) et aux LB. Elles sont capables d'apprêter les Ag pour les présenter dans le contexte CMH aux LT. Seules les DC sont capables de stimuler les LT naïfs, elles sont donc appelées également cellules professionnelles de présentation des Ag. Les progéniteurs myéloïdes et les cellules suppressives dérivées des myéloïdes (myeloid-derived suppressor cell en anglais MDSC) comme leur nom l'indique inhibent les CTL et les NK (343;344). Les MDSC sont capables également de changer leur phénotype et de ressembler aux cellules endothéliales, elles expriment alors leurs marqueurs de surface comme CD31 et VEGFR2 (345). D'autres cellules issues de la moelle osseuse notamment les monocytes peuvent aussi se différencier et/ou induire l'angiogenèse tumorale (346;347).

Une communication est nécessaire entre les cellules du microenvironnement et les cellules cancéreuses. Les cytokines sont des substances solubles de communication synthétisées par les cellules immunes principalement. Elles regroupent les familles d'IFN, d'IL, de TNF, de TGF, des facteurs de croissance de cellules hématopoïétiques (colony stimulating factors en anglais CSF) et de chimiokines (chimiotactiques de type CCL et CXCL).

Les cytokines interviennent dans la régulation des cellules effectrices immunitaires. Lorsqu'une cytokine se fixe à son récepteur, un signal intracellulaire est induit changeant l'expression des gènes, modulant la réponse immunitaire. D'autres cytokines appelées chimiokines ont pour principale fonction d'attirer certaines cellules cytotoxiques notamment.

Ainsi, les infiltrats leucocytaires peuvent soit être le témoin du développement d'une réaction immune favorable pour le patient, soit plutôt favoriser la croissance tumorale (348;349).

Nous allons étudier l'infiltration des cellules immunes dans le GBM dans le prochain paragraphe.

1.3.2. Cellules immunitaires décrites dans le GBM

Nous décrivons dans ce paragraphe les différentes publications étudiant l'infiltration de cellules immunes dans les gliomes et notamment dans les GBM et leur impact pronostique.

1.3.2.1. Infiltration macrophagique et microgliale

La présence de la microglie dans les tumeurs cérébrales a été rapportée en 1921 par Rio-Hortega (350) et sa capacité de phagocytose décrite pour la première fois par Penfield en 1925 (351). La première étude qui a rapporté une infiltration macrophagique (cellules exprimant FMC33) date de 1988, elle retrouve une infiltration plus importante dans les gliomes de haut grade (36% des 15 gliomes de haut grade) versus bas grade (26% des 5 gliomes de bas grade) (352). En IHC, les cellules macrophagiques sont décrites comme positives pour CD68 (159;353-357) ou CD11b (358) ou Iba1/AIF1 (190). Le ratio de macrophages de type M2 peut être recherché (nombre de cellules CD163+ / nombre de cellules Iba1+) (359). L'expression de HO-1, une enzyme du catabolisme de l'hème, est associée aux macrophages activés infiltrants et la densité vasculaire dans une autre étude (356). En cytométrie de flux, les cellules macrophagiques sont décrites comme CD11b+/c+ CD45^{high} et les cellules microgliales comme CD11b+/CD45^{low} (185;360).

Cette infiltration macrophagique et microgliale est l'infiltration de cellules immunes la plus fréquente dans les gliomes de haut grade. En effet, deux études rapportent que 100% des échantillons de gliomes de haut grade présentent une infiltration microgliale macrophagique (n=92 (361), n=21 (354)), et deux études retrouvent également cette infiltration dans 100% des GBM : dans les 63 échantillons de GBM publiés par Yang (357) et dans les 4 cas de GBM publiés plus récemment par Lu (159). Cette infiltration se situe dans plus de 90% des cas, en zone périvasculaire (361), (357). Cette infiltration de macrophages/microglie est également

prédominante par rapport aux autres cellules immunes, elle correspond à environ un tiers de l'infiltration de cellules immunes (352;354;362). Hussain rapporte environ 6 fois plus de cellules de microglie/macrophages que de lymphocytes (185;363), Parney un ratio de 3 (360) et Donson rapporte également un ratio de 5 entre l'infiltration maximale de cellules microgliales/macrophagique de cellules AIF1+ > 75^{ème} percentile sur la somme des infiltrations maximales de cellules LT CD4+ et LT CD8+ (190).

Le nombre moyen de cellules macrophagiques/microgliales infiltrantes est exprimé de diverses manières : nombre de cellules moyen compté en microscopie (moyenne de 11,9 +/- 10,3 avec des extrêmes compris entre 1 et 30 (352) pour un champ 10X (HPF), moyennes d'environ 100 cellules par agrandissement de 400 avec des extrêmes compris entre 32 et 162 (356) avec des extrêmes d'infiltration de cellules AIF1+ de plus du 75^{ème} percentile compris entre 0 et 220 cellules (190)) ; nombre par gramme de tumeur ($3,2 \cdot 10^6$ cellules par gramme de tumeur) (185), nombre en mm² (471, 81 cellules /mm²) (355), et en fonction du nombre de cellules viables en cytométrie de flux (moyenne de cellules microgliales =1,65% parmi les cellules viables, avec des extrêmes compris entre 0,37% et 3,92% et moyenne de cellules macrophagiques = 6,25% parmi les cellules viables, avec des extrêmes compris entre 1,56% et 15,3% (360).

Quatre études soulignent que l'infiltration de macrophages/microglie est plus élevée en cas de gliomes de haut grade versus les tumeurs de bas grade (355-357;364) une étude montre une infiltration plus élevée dans les GBM par rapport à du cerveau normal (353) et une autre versus des tumeurs non gliales (364).

Une étude montre une meilleure survie en cas d'infiltration par des cellules de type macrophagique (nombre de cellules AIF1+ > 75^{ème} percentile) (190). Une autre étude met en évidence une meilleure survie en cas de ratio CD163/CD68 ou CD163/AIF1 faible (355).

L'analyse de Rossi et *al.* ne retrouve par contre pas de lien entre l'infiltration macrophagique/microgliale et la survie. Une étude a rapporté une infiltration plus importante de cellules exprimant CD68+ et de cellules exprimant CD3+ chez les patients répondeurs à la radiothérapie (n=15) (204).

Les cellules de la microglie infiltrante proviennent de deux origines, soit de la microglie parenchymateuse intrinsèque soit des précurseurs sanguins de la moelle osseuse (365). Une BHE fonctionnelle n'empêche pas la migration des précurseurs de microglie dérivés de la moelle osseuse, en effet une étude a montré que ces cellules migraient en absence d'irradiation responsable de la rupture de BHE dans des cas d'astrocytomes pilocytiques (366). Les gliomes favorisent le recrutement et la prolifération de la microglie en sécrétant par exemple CCL2/MCP1, MCP3 via leur récepteur CCR2 exprimé à la surface des cellules microgliales, ou GM-CSF et G-CSF (367-369). Dans une étude, CX3CL1 est décrit comme capable non seulement de recruter les cellules microgliales/macrophagiques via leur récepteur CX3CR1, mais CX3CL1 augmente également l'expression de MMP-2, MMP-9 et MMP-14 dans ces cellules (370). Ces MMP induisent la dégradation de la matrice extracellulaire permettant la migration des cellules microgliales/macrophagiques mais également des cellules gliales. Les cellules gliales et microgliales secrètent IL6 et expriment son récepteur à leur surface (371;372). Or IL6 est capable d'induire la migration et l'invasion des cellules tumorales (372;373).

Hussain et *al.* ont montré dans leur étude que la microglie infiltrant les gliomes n'induit ni la sécrétion de cytokines inflammatoires telles que IL1 β et TNF α , qui jouent un rôle crucial dans la réponse immune innée, ni la médiation de la réponse immune acquise (185). Wu et *al.* confirment que cette infiltration est composée principalement de cellules polarisées en M2, qui ont une réduction de leur activité phagocytaire et de leur capacité de stimulation de la prolifération des LT via la sécrétion de cytokines immunosuppressive telles que IL10 et TGF β (187).

De plus, les macrophages infiltrant la tumeur se localisent préférentiellement au niveau des zones hypoxiques nécrotiques, où ils coopèrent avec les cellules gliales pour promouvoir l'angiogenèse via HIF1 et VEGF notamment (374). Dans les gliomes, L'infiltration macrophagique microgiale est corrélée à la densité vasculaire et favoriserait la vascularisation ou la néoangiogenèse (356).

La microglie est capable de créer un environnement immunosuppresseur favorable à la prolifération des cellules gliales, leur invasion et la néoangiogenèse (356;375-379).

1.3.2.2. Infiltration lymphocytaire

La première étude de l'infiltration de cellules immunes est une série d'autopsies publiée en 1971, qui a mis en évidence une infiltration lymphocytaire dans 65% des gliomes dont 14% correspond à une infiltration importante (380). Initialement, l'infiltration lymphocytaire était mise en évidence selon la morphologie histologique des lymphocytes au sein des gliomes (381-385). Trois de ces cinq études montrent que l'infiltration est associée à un meilleur pronostic dans le GBM (381-383).

En IHC, l'infiltration lymphocytaire est plus récemment mieux caractérisée par l'utilisation d'anticorps anti-Leu 4 CD3+ pour les LT, anti-Leu 3a, CD4+ pour les LT helper, anti-Leu 2a CD8+ pour les LT cytotoxiques, anti Ia CD20+ pour les LB. En cytométrie de flux, il est de plus mis en évidence au sein de la population lymphocytaire non seulement les lymphocytes helper et cytotoxiques mais également les LTreg qui sont par définition des LT CD4+ CD25+ FoxP3+.

Une infiltration lymphocytaire dans les gliomes a été rapportée dans 16 études (192;354;357;358;361;362;380-383;386-391), avec en moyenne une infiltration retrouvée dans 63% des cas de gliomes de haut grade (357;380-382;390;391), avec des extrêmes entre 11,5% (383) et 100% des gliomes infiltrés (358;389). Le nombre de lymphocytes infiltrants CD3+ varie d'une analyse à l'autre ainsi que les méthodes de comptage. En microscopie, une moyenne de 3,1 +/-3,0 de cellules CD3+ est retrouvée au grossissement x 10 dans une première étude (352), une moyenne de 1,98% de cellules CD4+ avec des extrêmes entre 0 et 37% et 1,26% de cellules CD8+ avec des extrêmes entre 0 et 8,2% au grossissement 400 dans une étude récente (190), et 212500 cellules per mm³ sont CD3+ dans une dernière étude (358). Par technique de cytométrie de flux, l'infiltration lymphocytaire CD45+CD11b- correspond à 2,5% cellules viables dans une étude (360) la fréquence d'infiltration moyenne est inférieure à 0,1% de cellules CD3+/CD4+ ou CD3+/CD8+ dans une autre étude (363). Une dernière étude définit les lymphocytes sur des critères de taille/structure et trouve une infiltration moyenne de 18% (extrêmes compris entre 12 et 21%) dans les GBM (293).

Au sein des lymphocytes, il est rapportée une prédominance de LT CD8+ cytotoxiques dans 7 études (352;354;389;391-394), contrairement à une étude qui retrouve une infiltration composée en prédominance de cellules CD3+/CD4+. A noter dans cette étude que les

lymphocytes exprimant CD8 n'expriment jamais le marqueur d'activation CD25, contrairement aux lymphocytes exprimant CD4 (363). Une infiltration en IHC de LTreg FoxP3+ est rapportée dans 48% des 52 GBM dans une première étude de tissu microarrays (386) et dans 36% des GBM secondaires et 43% des GBM primaires dans une deuxième étude (192). En cytométrie de flux, 4 autres études décrivent une infiltration de LTreg (293;363;395-397). Les pourcentages rapportés de LTreg parmi les lymphocytes sont variables selon les études en moyenne 14% des lymphocytes CD4+ sont CD4+/FoxP3+/CD25^{high}/CD127^{low} dans l'étude de Jacobs et *al.* (397), 25% des lymphocytes CD3+ sont CD4+/CD25^{high} dans l'étude de El Andaloussi et *al.* (398), 38,5% des cellules CD3+CD4+ expriment CD25 et FoxP3 dans l'étude de Crane et *al.* (395). Toutes ces études ont été faites par analyse en cytométrie de flux. Par technique d'IHC, il a été montré que les LTreg FoxP3+ représentent moins de 1% des lymphocytes totaux (190;192) ou 0,6% de l'ensemble de cellules (387). L'infiltration en LT et LTreg est corrélée positivement avec le grade dans 3 études (192;386;399).

Une infiltration de LB CD19+ est rare (354;400;401) voire absente (195), sauf dans 3 études qui mettent en évidence une infiltration dans 8% des cas de gliomes de haut grade (361) ; cette infiltration de LB correspond à 8,7% des cellules mononuclées dans une étude (352) et à 41% de l'ensemble des lymphocytes dans une autre (402).

Après un essai thérapeutique de vaccination, il est apparu une infiltration de LT CD8+ et mémoire CD45RO+, une augmentation non significative de LT CD4+ sans infiltration B dans une étude (195) et une infiltration plus forte de lymphocytes CD3+/CD8+ chez 9 patients ayant un GBM mésenchymateux avec une survie plus longue versus les 5 patients ayant un GBM proneural (403). Une infiltration lymphocytaire périvasculaire de bon pronostic est

également rapportée après une immunothérapie associant IL2 et LAK (404). Chez les répondeurs à la radiothérapie, il est également mis en évidence une infiltration plus importante de cellules CD3+, sans infiltration de cellules exprimant CD20 (204).

L'association de cette infiltration lymphocytaire avec la survie reste controversée. Une étude montre un impact négatif de l'infiltration lymphocytaire (388), une autre rapporte une tendance négative non significative (361), et une étude ne met pas en évidence de lien avec la survie (390). Six autres études rapportent une association positive de l'infiltration lymphocytaire avec la survie avec un allongement de la survie en cas d'infiltration (190;381;387;405), ou la présence d'une infiltration chez les longs survivants (382). Deux études mettent en évidence un impact négatif de l'infiltration de LT notamment de l'infiltration de LTreg mesurée par qMSP (399), ou en séparant les 83 patients en 2 groupes selon un seuil arbitraire d'infiltration de LTreg de plus de 10% des lymphocytes CD4+ ou inférieure ou égale à 10% (397). Une étude a comparé 8 échantillons issus de GBM récidivant aux 8 échantillons correspondant aux mêmes patients lors de la prise en charge initiale. Une augmentation non significative de LT CD4+ et FoxP3+ et une diminution non significative CD8+ sont rapportées (387). L'infiltration de LTreg est corrélée avec un grade élevé et le type astrocytaire (386) avec une infiltration plus importante dans le GBM. Jacobs et *al.* ont rapporté qu'une infiltration élevée est associée à une survie globale plus courte dans 83 échantillons tumoraux, mais cette association n'est pas significative dans le sous-groupe de GBM (n=29) (397). CCL22 est synthétisé par les GBM et son récepteur est retrouvé au niveau des LTreg infiltrant les GBM (397). Différents autres facteurs sécrétés par les cellules de GBM vont promouvoir l'arrivée, la survie et la prolifération des LTreg (395).

L'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) favorise le recrutement de LTreg, avec une association négative avec la survie (406). Un blocage de CTLA-4 par l'ipilimumab est efficace dans les modèles expérimentaux de GBM (407) et chez les patients traités pour un mélanome avec des métastases cérébrales (408). L'inhibition d'IDO et de CTLA-4 pourrait devenir une thérapeutique efficace via les LTreg.

1.3.2.3. Infiltration NK

L'infiltration en cellules NK (CD16+ ou IOT-10+) a été rapportée dans 7 études publiées (352;357;358;389;390;392;401), allant de 2,5% à 40% des échantillons de gliomes, principalement des GBM. Sur les 7 échantillons de gliomes de haut grade analysés par Kuppner et *al.*, 3 présentent une infiltration de cellules NK considérée comme élevée en IHC avec 10 à 25% de l'ensemble des cellules positives, 3 faibles avec 1 à 5% de cellules positives et 3 rares < 1% de cellules sont positives (392).

L'infiltration de TIL a été analysée en cytométrie dans une autre étude avec un pourcentage moyen de cellules NK CD56+ égal à 2,5% avec des extrêmes compris entre 1 à 6% des cellules (389). Yang et *al.* ont publié en 2011 que l'infiltration de NK CD56+ est plus fréquente dans le GBM, notamment en intratumoral comme en périvasculaire par rapport aux astrocytomes pilocytiques de grade I (357).

Aucun lien entre l'infiltration de NK et la survie a été mis en évidence (390).

1.3.2.4. Infiltration de polynucléaires

Une infiltration par des polynucléaires éosinophiles a été mise en évidence lors des ré-interventions après immunothérapie par IL2 et LAK, avec un impact pronostic positif. L'infiltration par des polynucléaires éosinophiles est retrouvée chez 5 des 7 patients réopérés, dont 2 ont une éosinophilie périphérique de 33 et 19% des leucocytes (404;409). L'infiltration par des éosinophiles n'est retrouvée ensuite que dans une étude et uniquement dans les tumeurs tératoïdes/rhabdoïdes atypiques et non dans les GBM (159).

Les éosinophiles sont des cellules effectrices de l'allergie (410). Dans le modèle murin, il a été montré que l'effet antitumoral d'IL4 est associé à une infiltration d'éosinophiles (411-413). Le GBM secrète notamment du GM-CSF, CXCL12, CXCL8, PDGF, qui activent les éosinophiles et les cellules de la réponse immune innée (microglie, neutrophiles...) (414).

Les éosinophiles activés produisent de la neurotoxine dérivée des éosinophiles (eosinophil derived neurotoxin en anglais EDN), ligand de TLR2, qui active les cellules dendritiques *in vivo* et favorise la réponse immune Th2 (415). Les éosinophiles activés secrètent également du VEGF, qui favorise l'angiogenèse (416).

D'autres études ont rapporté, par une étude en IHC, une infiltration de polynucléaires neutrophiles CD15+ myéloperoxydase+ dans 70% de 105 gliomes dont 85% de 58 GBM (417) et une infiltration de cellules Elastase+ dans 4 échantillons de GBM (418). L'expression de l'ostéopontin, qui est localisée dans les neutrophiles et macrophages dans le GBM, est significativement plus forte dans 13 échantillons versus 5 cerveaux normaux (353;417;418). L'infiltration de neutrophiles est corrélée positivement avec le grade (353;417;418). L'infiltration est principalement retrouvée située proche des zones nécrotiques avec une infiltration cellulaire élastase positive moyenne de 14,2% +/- 6,4% de l'ensemble des cellules avec des extrêmes compris entre 8,2 à 21,6% des cellules (418).

L'infiltration de neutrophiles est associée à un mauvais pronostic dans le mélanome (419), le cancer broncho-pulmonaire (420), le cancer colique (421) et dans le cancer gastrique (422). L'IL8 et CXCL6 sont des chimiokines qui attirent les neutrophiles notamment dans le GBM (423;424). L'expression de l'ostéopontin est associée significativement à la présence de neutrophiles et de macrophages (353;417;418). Ces neutrophiles infiltrants sont en cours d'étude, il en existerait deux phénotypes : le type N2 protumoral sous l'action de TGF β via la production de MMP-9 par exemple qui favorise la protéolyse de la matrice extracellulaire et la production de facteur angiogénique de type VEGF (425;426) et le type N1 antitumoral par l'action de la myéloperoxidase ou via la sécrétion de protéases et des cytokines (427-429).

1.3.3. Description des autres populations cellulaires ayant un rôle sur le développement de la réponse immune

1.3.3.1 Cellules souches gliomateuses

L'origine des cellules cancéreuses a été longuement étudiée. La notion de cellules souches a été rapportée pour la première fois par Lapidot dans la leucémie myéloïde aigüe (430) et par Singh dans les tumeurs cérébrales (431). Elles ont comme propriétés fonctionnelles d'être capables de proliférer, de se différencier, de s'auto-renouveler, et d'induire des tumeurs après injection dans un modèle animal immunodéprimé (162). Les cellules souches gliomateuses (CSG), comme les cellules souches cancéreuses ou initiatrices de tumeurs, ont des marqueurs plus ou moins caractéristiques à leur surface comme CD133 ou prominin 1 humaine (226), les molécules d'adhésion cellulaires L1 (L1 cell adhesion molecule en anglais LICAM) (432), intégrine $\alpha 6$ (433), A2B5 (434;435). Elles sont caractérisées également par des marqueurs intracellulaires : Olig2, Sox2, Bmi1, musashi, ALDH (436-442). Le récepteur du TGF β joue un rôle dans le maintien du phénotype de CSG via l'expression de Sox 2 / Sox 4 et le facteur inhibiteur de leucémie (leukemia inhibitory factor en anglais LIF) (443;444). Bien que le

caractère CD133+ en IHC soit insuffisant pour définir les CSG (445;446), il semble témoigner d'un impact pronostique négatif pour les patients ayant un GBM avec des cellules CD133+ (208;447-449).

Les GSC sont capables de se différencier en astrocytes, neurones ou oligodendrocytes (97;101), mais également en cellules endothéliales avec la persistance de mutations génétiques (amplification de l'*EGFR* et du chromosome 7) et une co-expression de nestin et CD144+ (450). Elles expriment des métalloprotéases (451;452), secrètent du VEGF qui favorise la migration des cellules endothéliales *in vitro* et la vascularisation et les hémorragies intratumorale *in vivo* (437;453).

Les cellules souches cancéreuses (454;455) et notamment gliomateuses sont enrichies au niveau de zones appelées niches autour des vaisseaux et des zones de nécrose hypoxique (213;456). Ces niches contiennent différentes cellules qui sécrètent des facteurs qui maintiennent l'homéostasie entre les divisions symétriques et asymétriques c'est-à-dire entre la prolifération-différenciation et l'auto-renouvellement. Elles semblent être une des causes de la résistance aux traitements, notamment des cellules souches au témozolomide *in vivo* (457). Les liens entre les GSC et la vascularisation sont complexes et pas encore totalement élucidés. Les intégrines notamment l'intégrine $\alpha 6$ et la laminine jouent un rôle important dans les relations entre la matrice extracellulaire et ces niches périvasculaires (433). Les facteurs HIF-1 α et HIF-2 α sont impliqués dans la maintenance des cellules souches gliomateuses, notamment dans les zones hypoxiques des niches qui correspondent *in vivo* aux zones de nécrose palissadique (458-462). Les CSG sont également impliquées dans l'invasion tumorale (463) et elles peuvent induire une immunosuppression en favorisant la différenciation en LTreg, en inhibant la prolifération et l'activation des LT et en induisant leur apoptose, via l'expression de B7-H1 et la sécrétion de galectine 3 (464-466), et via la sécrétion de cytokines immunosuppressives (187).

1.3.3.2 Fibroblastes associés au cancer

Les fibroblastes associés au cancer (cancer-associated fibroblast en anglais CAF) jouent un rôle important sur l'initiation, la prolifération, l'invasion des cellules carcinomateuses et sur l'angiogenèse (467-470). Les fibroblastes sont la principale origine des CAF mais ils peuvent également dériver des cellules endothéliales, épithéliales et des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse (471;472).

Les CAF, exprimant la protéine de surface fibroblastique FSP, le récepteur β du PDGF (PDGFR β) et l'actine des muscles lisses (α -smooth muscle actin en anglais α -SMA), ont un rôle important dans les carcinomes. Ces 3 marqueurs sont retrouvés à la surface des cellules stromales associées au GBM (GB-associated stromal cell en anglais GASC) contrairement au marqueur macrophagique (CD14) et endothélial (CD31). Les GASC sont impliqués également dans la tumorigenèse des cellules gliales *in vitro* et *in vivo* (473).

1.3.3.3. Cellules endothéliales

Les cellules endothéliales créent une néovascularisation après le switch angiogénique qui permet aux cellules quiescentes endothéliales de s'activer (474). Les péricytes sont des cellules mésenchymateuses spécialisées, qui recouvrent les vaisseaux influençant ainsi la capacité des tumeurs à former des métastases (475;476). Les cellules endothéliales et les autres cellules du microenvironnement en général interagissent avec les cellules cancéreuses et les unes avec les autres. Elles ont également une capacité de phagocytose notamment dans le SNC constituant une seconde ligne de défense après la BHE (477;478).

La BHE, localisée anatomiquement au niveau de la paroi capillaire cérébrale, est constituée par des cellules endothéliales reliées par des jonctions serrées, limitant la perméabilité des solutés ioniques non liposolubles. Une tumeur entraîne un dysfonctionnement local par ouverture des jonctions serrées, fenestration capillaire, augmentation de l'activité vésiculaire pinocytaire et disparition de ces astrocytes péricapillaires.

1.3.4. Le GBM : un environnement très immunosuppresseur

Le microenvironnement joue un rôle important et complexe dans le développement d'une tumeur notamment d'un GBM (479), en influençant entre autres les GSC (433) et inversement. Bien que les cellules gliomateuses et les GSC peuvent être reconnues spécifiquement par les lymphocytes T et éliminées (480-482), le microenvironnement tumoral favorise l'absence de reconnaissance efficace des cellules cancéreuses par les cellules immunes dans un contexte d'immunosuppression (187;464-466;483).

La tolérance correspond ainsi à l'absence de réaction immune, qui aurait du être induite normalement et/ ou l'absence d'efficacité de la réaction immunitaire par divers phénomènes d'échappement. Les différents mécanismes d'immunomodulation dans le GBM humain ont été rapportés dans un récent article rédigé par Tony Avril et *al.* (484) (Cf.Figure 8).

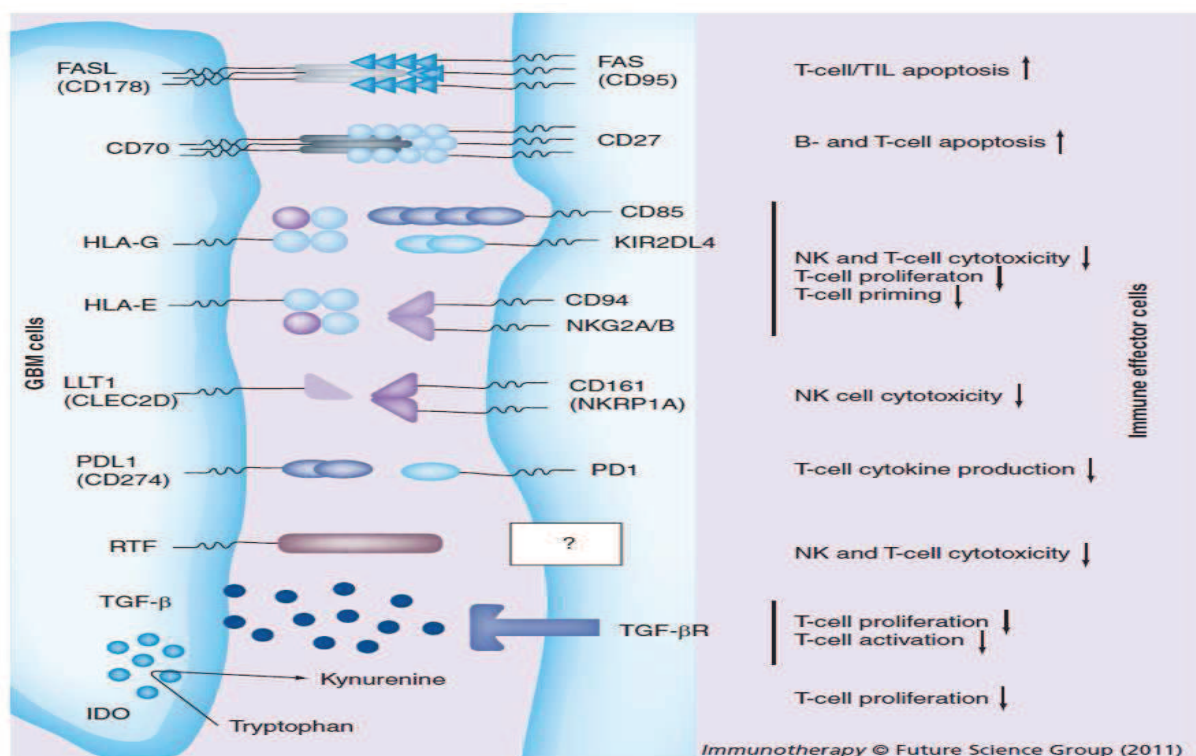


Figure 8 : molécules immunosuppressives exprimées par les GBM avec leur cibles moléculaires et leur actions sur les cellules immunes effectrices (484).

FASL : FAS ligand, GBM : glioblastome multiforme, NK : natural killer, TIL : tumor infiltrating lymphocyte.

Dans notre équipe, nous avons analysé l'expression des molécules immunomodulatrices (*Fas Ligand*, *HLA-G*, *IDO*, *PD-L1*, *TGFβ1-3*) par une analyse transcriptomique de 20 GBM. L'expression de ces molécules est retrouvée respectivement dans 15%, 60%, 85%, 30%, 70%, 80% et 35% des échantillons. L'expression d'ARNm a été confirmée sur 10 lignées primaires de GBM, et 2 lignées immortalisées U251 et U87 (485). Nous avons étudié ces molécules du point de vue fonctionnel. Ainsi IDO inhibe la prolifération lymphocytaire et un anticorps anti-PD-L1 augmente la production d'IFN γ par des LT spécifiques de Melan-A en réponse aux lignées primaires de GBM chargées par un peptide Melan-A. Ces deux molécules pourraient être des cibles d'immunomodulation pour que l'immunothérapie soit plus efficace.

ARTICLE N°4: (484)

Mechanism of immunomodulation in human glioblastoma.

Avril T, Vauleon E, Tanguy-Royer S, Mosser J, Quillien V.

Immunotherapy. 2011 Apr; 3 (4 suppl) : 42-44.

ARTICLE N°5: (485)

Distinct effects of human glioblastoma immunoregulatory molecules programmed cell death ligand-1 (PDL-1) and indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) on tumour-specific T cell functions.

Avril T, Saikali S, Vauleon E, Jary A, Hamlat A, De Tayrac M, Mosser J, Quillien V.

J Neuroimmunol. 2010 Aug 25 ; 225 (1-2) : 22-33

1.4. Objectifs généraux de la thèse

Comme nous l'avons souligné précédemment, le système immunitaire semble intervenir dans la gliomagenèse. Cependant, aucune signature génique robuste associée à une fonction immunitaire n'a pu être formellement établie et validée dans la littérature.

Nous avons donc voulu dans ce travail de thèse vérifier quels gènes immunitaires étaient les plus impliqués dans le GBM. Dans ce but, nous avons étudié l'expression des gènes immunitaires dans des échantillons de cerveaux normaux par rapport à des échantillons de GBM. Ensuite nous avons analysé les échantillons des GBM entre eux pour rechercher les gènes immunitaires différentiellement exprimés et ainsi découvrir si possible une signature génique immunitaire.

Nous avons ensuite étudié les interactions des gènes immunitaires dans le GBM par une analyse de co-expression network, pour mettre en valeur si possible, une signature immunitaire cellulaire et fonctionnelle dans le GBM.

Nous avons voulu ensuite déterminer si les gènes immunitaires pouvaient avoir un impact sur la survie des patients traités pour un GBM, pour mettre en valeur une signature immunitaire pronostique. Nous avons donc étudié la signature fonctionnelle des modules de co-expression network trouvés précédemment en fonction de la survie. Nous avons analysé également l'impact sur la survie des gènes immunitaires selon différentes méthodes statistiques, puis nous avons établi un modèle mathématique de risque. Ce modèle permet de combiner le niveau d'expression de six gènes pour calculer un score de risque directement lié à l'espérance de vie du patient. Nous avons ensuite vérifié la robustesse de cette signature immunitaire pronostique sur différentes séries de données publiées et locales, selon différentes technologies.

Enfin, nous avons voulu caractériser *in vivo* la signature cellulaire évoquée dans l'analyse de co-expression network. La population cellulaire immune infiltrante a donc été étudiée par cytométrie de flux à partir de tumeurs issues de GBM. Nous avons analysé l'infiltration également en fonction de la conservation (fraîche ou congelée), en fonction du grade ou de la zone prélevée (zone tumorale, péri-tumorale ou non tumorale dans des cas de cortectomie pour épilepsie), en fonction de l'âge des patients et en fonction des corticoïdes reçus en préopératoire. Nous avons caractérisé en cytométrie de flux les sous-populations infiltrantes retrouvées grâce à différents marqueurs. Enfin, nous avons aussi recherché une corrélation entre la population immune infiltrante et la survie.

L'analyse de l'environnement immunitaire des GBM permettra ainsi de comprendre les limites et les perspectives de l'immunothérapie. En effet, cette approche thérapeutique n'a pas permis d'obtenir un bénéfice clinique majeur jusqu'à présent en neuro-oncologie. Mais la connaissance de la population immune majoritaire, des propriétés immunomodulatrices de ces cellules pourront améliorer la définition des cibles potentielles de l'immunothérapie.

Nous allons décrire chaque partie en rapportant tout d'abord les objectifs, le matériel et les méthodes utilisés, puis les résultats que nous discuterons avant de conclure.

2. GENES IMMUNS, SIGNATURE IMMUNE GENIQUE, FONCTIONNELLE ET PRONOSTIQUE

2.1. Objectifs

Ce travail a consisté à étudier l'expression de gènes liés directement ou indirectement à l'immunité dans le GBM afin de rechercher une signature génique associée à des fonctions immunes et ayant une valeur pronostique.

Pour mettre en évidence une signature génique immune, nous avons identifié des gènes immuns d'expression différentielle entre le cerveau non tumoral et le GBM dans un premier temps. Nous avons ensuite recherché les gènes immuns présentant une forte variation de l'expression au sein même des GBM pour établir des « profils immunitaires » des GBM.

Nous avons ensuite évalué leur robustesse clinique. Les gènes immuns ont été regroupés en module de co-expression en fonction de leur profil d'expression génique. Pour chaque module, des processus biologiques distincts ont pu être associés afin d'inférer des fonctions immunes potentielles.

Nous avons recherché les gènes immuns associés à la survie pour définir une signature immune pronostique. Nous avons premièrement recherché une association entre la survie et les gènes immuns selon différentes méthodes statistiques. Nous avons établi secondairement un modèle mathématique de risque à base de gènes immuns, permettant de différencier des groupes de patients traités pour un GBM en fonction de leur survie globale. Nous avons ensuite vérifié la robustesse de ce modèle de risque mathématique sur différentes données publiées et locales, selon différentes technologies.

2.2. Matériels et méthodes

2.2.1. Gènes

Les gènes immunologiques que nous avons sélectionnés sont ceux associés au processus immun humain selon AmiGO (GO : 0002376 : 505 gènes), auxquels nous avons ajouté les gènes des cytokines, chimiokines et ceux reconnus comme intervenant dans l'immunomodulation (286 gènes) (Cf. ANNEXE 1). Ainsi 791 gènes ont été analysés correspondant à 1291 sondes Affymetrix.

2.2.2. Patients et jeux de données

Pour identifier les gènes immuns qui sont différentiellement exprimés dans le GBM, nous avons analysé les profils d'expression des gènes immuns dans le cerveau non tumoral comparativement au GBM. Nous avons utilisé ainsi les données de la cohorte GDS 1962 publiée par Sun. Il s'agit des données de biopuces de 23 cerveaux normaux et de 81 glioblastomes (486). Puis pour comparer les profils au sein des GBM, nous avons utilisé le jeu de données de la méta-analyse établie par M. de Tayrac et M. Aubry de notre laboratoire (169). Ce jeu comprend 3 cohortes décrites et annotées dans la littérature, correspondant à 216 GBM au total et 115 GBM dont la survie des patients est décrite (164;221;486).

L'analyse de co-expression network a porté sur les données de biopuces Affymetrix les plus récentes, publiées par Lee et *al.* (165) et obtenues à partir 161 GBM (GSE13041).

Pour associer l'expression de gènes immuns avec la survie des patients et déterminer les gènes immuns ayant un impact sur la survie globale, nous avons utilisé les données de 115 GBM inclus dans la méta-analyse publiée par de Tayrac et *al.*, dont la survie des patients est connue (169) comme criblage et entraînement selon 3 différentes méthodes statistiques.

A partir de ce jeu de données, nous avons établi un modèle de survie à base de 6 gènes immuns. Pour la validation de ce modèle, nous avons utilisé plusieurs séries de données de biopuces Affymetrix accessibles, publiées par Verhaak et *al.*, Petalidis et *al.* et Lee et *al.* (147;165;487) et une série de données de biopuces Agilent obtenues à partir de 41 glioblastomes et glioblastomes à cellules géantes (renommés récemment tumeur glioneuronale maligne (TGNM)) issus des services de neurochirurgie de Rennes et d'Angers. Une dernière étape de validation a été effectuée par une autre technologie d'amplification après rétro-transcription de l'ARN (reverse transcriptase polymérase chain reaction quantitative en anglais :RT Q-PCR) sur une série locale de 57 GBM traités par la séquence thérapeutique standard (protocole publié par Stupp (74)).

Tous les patients ont signé un consentement autorisant les études de recherche sur leurs échantillons tumoraux.

Les caractéristiques des différents patients (sexe, âge, indice de performance status), des traitements reçus (type de chirurgie : exérèse partielle, totale ou biopsie, traitement adjuvant : radiothérapie, radio-chimiothérapie) et de la tumeur (statut *MGMT*, *IDH1*, sous-type génomique) des différents jeux de données y compris des cohortes locales sont résumées dans le tableau ci-dessous (Cf. Tableau 3).

Nom	de Tayrac (169)	Lee (165)	Verhaak (147)	Petalidis (487)	Cohorte locale 1	Cohorte locale 2
Set de données	GSE4271 GSE4412	GSE13041	TCGA Data	GSE2727	CHU Rennes CHU Angers	CHU Rennes
Technologie	Affymetrix	Affymetrix	Affymetrix	Affymetrix	Agilent	Q-PCR
Nombres d'échantillons	115	161	173	39	41	57
Sexe	M:65 F:50	M:96 F:65	M:112 F:61	M:29 F:10	M:21 F:20	M:31 F:26
Age (ans)	médian [min-max] <50 >=50	48 [18-82] 55 [22-86] 59	59 [14-87] 56 117	61 [22-74] 14 25	58 [33-80] 10 31	59 [36-78] 10 47
KPS (%)	médian <=70 >70 ND	- - - -	90 [40-100] 22 58	- - - -	80 [40-100] 15 23 3	80 [40-100] 28 29 -
Traitement (chirurgical)	biopsie exérèse partielle exérèse totale ND	- - - -	6 - 164 1	(c)	1 8 26 6	2 17 38 -
Traitement (adjuvant)	RT RT+ CT (Stupp) sans traitement	- - -	(b)	(c)	3 37 1	- 57 -
MGMT (promoteur)	méthylé non méthylé ND	86 75 -	42 122 -	- - -	24 17 -	27 29 1
IDH1	sauvage muté ND	- - -	167 6 -	- - -	39 2 -	39 1 17
Sous-type	proneural non proneural	41 120	48 125	- -	12 29	- -

(a) uniquement exérèse de mentionné

(b) traitement hétérogène: GBM de novo sans traitement antérieur

(c) données non disponibles (ND)

Tableau 3 : caractéristiques des patients et des sets de données.

Les caractéristiques des patients (sexe, âge, indice de performance status), des traitements (type de chirurgie, traitement adjuvant) et de la tumeur (statut *MGMT*, *IDH1*, sous-type génomique) des différents jeux de données sont décrites dans ce tableau.

2.2.3. Méthodes

2.2.3.1. Profils immuns différentiels entre cerveaux non tumoraux et GBM, et au sein des GBM

Nous avons recherché une différence d'expression des gènes immuns entre les cerveaux normaux et les GBM. Nous avons comparé les deux classes par une analyse différentielle, qui détermine le seuil de significativité au dessus duquel un gène sera considéré comme significativement différentiellement exprimé entre des conditions (classes). Les méthodes les plus utilisées sont l'analyse de variance et les tests de comparaison de moyennes (test de Student, Wilcoxon, Mann-Whitney). Pour cela, nous avons utilisé le logiciel TIGR MeV. Le différentiel d'expression entre les deux classes a été évalué par un test de Student avec correction des p-values selon la méthode de Bonferroni.

Secondairement, nous avons voulu déterminer s'il existait des différences d'expression des gènes au sein des GBM. L'analyse de détermination de classes, ou classification non supervisée, définit des groupes de données similaires, ou classes, sans *a priori* selon des critères de liaison ou d'agrégation. Ces classes concernent les gènes et/ou les individus. Les méthodes de classification utilisées se basent sur une mesure de distance/similarité (coefficient de Pearson, distance Euclidienne) et, en fonction de l'algorithme, elles sont agglomératives (groupement hiérarchique) ou de partitionnement (K-means, Partitioning Around Medoids PAM et Self-Organizing Maps). Nous avons ainsi utilisé la méthode d'établissement des classes par l'algorithme k-means puis validé ces classes par une seconde méthode de partitionnement : PAM.

2.2.3.2. Analyse des réseaux de co-expression

Nous avons ensuite analysé les réseaux de co-expression des gènes immuns à partir des données de GSE13041 dernièrement publiées par Lee et *al.* grâce au package WGCNA de R. Premièrement, la similarité (s) entre les gènes immuns pris deux à deux a été calculée grâce au coefficient de corrélation de Pearson calculé sur les données d'expression de ces gènes. Cette mesure de similarité est élevée à la puissance six pour obtenir une mesure d'adjacence (a) entre chaque paire de gènes ($a=s^6$). La relation log-linéaire qui existe entre similarité et adjacence [$\log(a) = 6*\log(s)$] permet en effet de conserver l'aspect quantitatif de la co-expression entre les gènes. Enfin, la mesure de proximité ou de recouvrement topologique (t) prend en compte l'adjacence des gènes un à un, mais aussi l'adjacence de chaque gène par rapport à l'ensemble des gènes voisins autour du gène étudié. Cette mesure reflète ainsi le degré de connectivité d'un gène au sein du réseau de co-expression.

L'analyse de la co-expression pondérée des gènes reflètera donc non seulement la corrélation des gènes proches un à un mais également la connectivité des gènes plus ou moins proches de plusieurs autres gènes en tenant compte de la topologie du réseau de gènes calculée selon la méthode des co-expression network publiée par Zhang (488). Une analyse de détermination de classes hiérarchiques, ou clustering, des mesures de proximité par un algorithme de coupe dynamique du dendrogramme obtenu (489) a permis ensuite de définir des classes ou modules de co-expression.

Au sein de chaque module, nous avons défini par réduction de dimension (Singular Value Decomposition) un gène « type » baricentre du module dit « eigen gène ». Ainsi, le module constitué d'un certain nombre de gènes peut alors être réduit à un seul gène représentant le module, pour faciliter l'analyse de corrélation.

Nous pouvons également étudier plusieurs gènes les plus représentatifs du module (top 20 gènes), qui correspondent par exemple aux gènes les plus corrélés à l'eigen gène du module ou aux gènes dont la connectivité intra-modulaire est la plus forte (« hub » gènes) (490).

2.2.3.3. Annotations fonctionnelles et enrichissement des modules de gènes des réseaux de co-expression

Nous avons ensuite analysé les modules en recherchant les catégories fonctionnelles (termes GO, mots-clés Swissprot, etc.) statistiquement associées au module (enrichi) par rapport à une référence constituée du génome humain complet. Cette annotation fonctionnelle des modules de co-expression des gènes immuns a été basée sur l'analyse des gènes constitutifs du top 20 de chaque module. Nous avons utilisé le logiciel DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) pour tester chaque module en enrichissant en terme GO, PIR family, voie de signalisation Panther ou Kegg, Interpro ou mots clés Swiss Prot.

La recherche d'associations entre les modules et la survie a été effectuée par le package *survival* de R (recherche d'une sur-représentation de gènes immuns associés à la survie dans chaque module à l'aide d'un test exact de Fisher avec ajustement des p-values selon la méthode de Benjamini).

2.2.3.4. Trois méthodes d'analyse de survie

Plusieurs méthodes ont été utilisées pour identifier les associations pertinentes avec la survie : la méthode d'analyse de Cox pas à pas (491), l'analyse des différences d'expression entre le 1^{er} et le 4^{ème} quartile de survie des patients, et la méthode de Cox avec l'expression des gènes immuns (comme prédicteur) et la survie globale en mois (comme réponse) (491).

Un ajustement a toujours été effectué selon la correction de Benjamini devant la réalisation de tests multiples. La survie globale est estimée selon la méthode de Kaplan-Meier et la comparaison des groupes a été réalisée par un test du log-rank.

2.2.3.5. Modèle de risque de gènes immuns

Un modèle mathématique permettant de calculer une probabilité de survie pour un patient a été construit à partir des gènes immuns associés à la survie. A l'aide des fonctions des packages survival et survivalROC du logiciel R, nous avons sélectionné les gènes les plus représentatifs de l'association à la survie et estimé les coefficients de régression d'un modèle de survie optimal (modèle de risque proportionnel de Cox) après ajustement aux facteurs de l'étude.

Pour augmenter la robustesse, nous avons sélectionné les gènes associés à la survie par la répétition un millier de fois de la séparation entre les cohortes d'entraînement et de validation, en éliminant les faux négatifs grâce à la correction selon Benjamini et le seuil significatif de la p-value inférieur à 0,01. Dans le modèle ainsi obtenu, les niveaux d'expression des gènes immuns retenus sont pondérés par les coefficients de régression et combinés de manière additive selon la formulation d'un modèle de Cox. Les gènes sélectionnés et pondérés ne sont donc pas ceux qui ont l'impact sur la survie le plus significatif individuellement mais ceux dont la somme d'expression pondérée est la plus pertinente pour classer les patients en deux groupes pronostiques de survie différente.

Le modèle mathématique permet ainsi pour chaque individu de calculer une probabilité de survie, chiffre compris entre 0 et 1, à un temps t . Cette probabilité de survie de chaque individu est calculée à partir d'une survie médiane de base propre à la cohorte à laquelle appartient l'individu, qui est ensuite pondérée par un facteur d'ajustement dérivant de

l'expression des gènes du modèle. Après détermination d'un seuil optimal en utilisant la méthode *survivalROC*, le risque peut être dichotomisé en une variable qualitative. Le modèle de risque mathématique permet ainsi de séparer la population en deux sous-groupes de pronostic différent : haut risque et bas risque de décès.

Toutes les analyses de survie ont été stratifiées sur l'âge afin de prendre en compte l'effet de ce facteur confondant. Le statut MGMT des cohortes locales a été obtenu par pyroséquençage en prenant comme seuil de méthylation des îlots CpG une valeur de 9% (moyenne des 5 CpGs analysés). La détermination du sous-type de GBM est basée sur la méthode de classification selon les centroïdes publiée par Verhaak et *al.* (147).

2.2.3.6. Procédure de RT Q-PCR

L'ARN total a été isolé par le kit commercialisé par QIAGEN Rneasy Plus Mini® à partir d'échantillons de GBM congelés. L'intégrité des ARN a été confirmée en utilisant le bioanalyseur Agilent Bioanalyser (RNA 6000 NAno assay kit®). La synthèse d'ADN complémentaire a été obtenue par le kit High capacity cDNA Reverse Transcription avec un inhibiteur Rnase (biosystème Applied®). La réaction de Q-PCR a été faite avec un appareil 7900HT Fast Real-time PCR System.

Des sondes Taq Man FAM ont été utilisées pour mesurer l'expression des 6 gènes du modèle de risque: *ACVR2A*, *ARG1*, *CD22*, *FGF2*, *MNX1* et *RPS19*. Trois gènes de ménage ont été choisis : *TBP* (TATA box binding protein), *HPRT1* (hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1), *GAPDH* (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase). Des cellules hépatiques, des cellules testiculaires, des lymphocytes B et des cellules issues de la lignée de GBM U251 ont servis de contrôles positifs.

Le ΔCt correspond à la différence pour chaque échantillon entre la valeur du Ct du gène cible et la moyenne des Ct des 3 gènes de ménage. Nous avons ensuite analysé les données en déterminant le $\Delta\Delta Ct$, qui correspond à la différence entre le ΔCt de l'échantillon et le ΔCt du calibrateur (pool de cerveaux normaux).

2.3. Résultats

2.3.1. Profils immunologiques entre cerveaux normaux et GBM et au sein des GBM

L'analyse de comparaison de classes entre les cerveaux non tumoraux dits normaux issus de cortectomie pour épilepsie et les GBM a mis en évidence 736 sondes différentielles significativement par le t-test sur les 1291 sondes analysées ($p < 0,01$). Les 736 sondes différentielles correspondent à 473 gènes différents ($p < 0,01$). Ainsi parmi ces gènes différentiels, nous retrouvons certains gènes immuns qui ont déjà été décrits dans la littérature. Parmi les 250 gènes les plus variants, nous retrouvons des gènes immuns codant pour les clusters de différenciation (CD 200, CD44, CD163, CD99, CD93...), pour des interleukines (IL10, IL6ST, IL15, IL24, IL18, IL7...) et leurs récepteurs (IL13RA1, IL1RAP, IL10RA, IL17RC, IL4R...), pour des chimiokines (CX3CL1, CXCL10) et leurs récepteurs (CXCR4, CXCR7), pour les molécules de la voie de signalisation d'IFN (IFI16, IFNAR2, IFI35, IFNGR2, IFITM3...), pour les TLR (TLR2, 3, 1 et 5), pour les molécules HLA (HLA-A, C, F, DRB1, DPA1, DRA, DQB1, G, E, DQA1 et DQA2) et pour les récepteurs de facteurs de croissance (IGF2R, FCGR2A, IGFBP3, FCGR2C, FCGR1C...). Les gènes suivants *FGF2*, *CD22*, *MNX1* et *RPS19*, qui ont également une implication dans le système immunitaire, sont également variants de manière significative entre les GBM et les cerveaux normaux non tumoraux.

Si nous considérons une différence plus stringente, un nombre important de sondes restent différentiellement exprimées entre les cerveaux normaux et les GBM : 623 sondes à $p < 0,001$ et 478 sondes à $p < 0,00001$. Une représentation de profils d'expression des gènes entre les cerveaux normaux et les GBM est dépeinte ci-dessous (Cf. Figure 9). La couleur verte est en faveur d'une sous-expression alors que le rouge est en faveur d'une surexpression. L'expression de chaque gène est représentée en horizontal et les échantillons (cerveau non tumoral et GBM) sont représentés en vertical. Deux profils différents sont observés, le cadre bleu entoure le profil des cerveaux non tumoraux appelé profil normal par rapport au reste des données qui correspondent au profil des GBM.

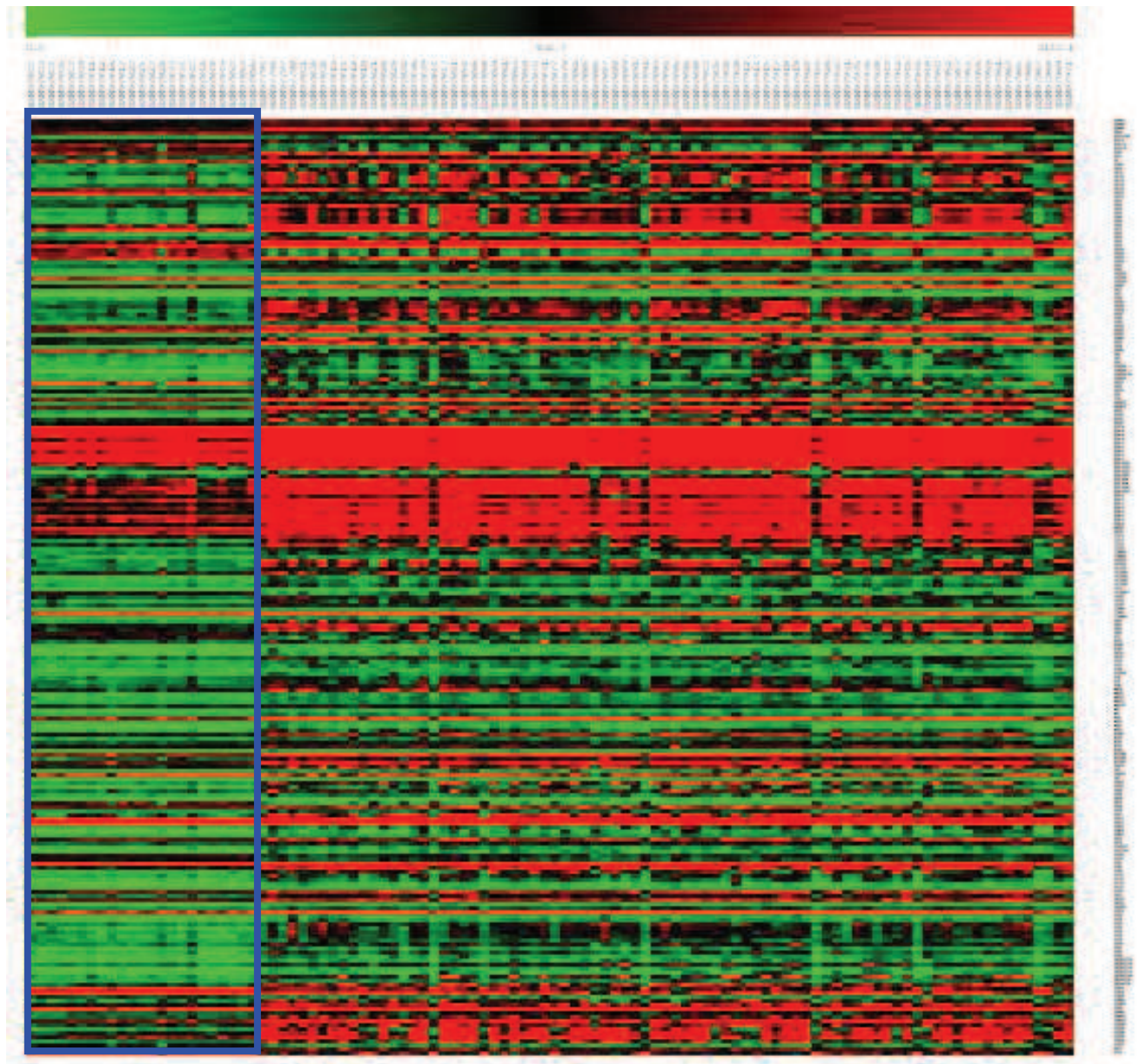


Figure 9 : profil immunologique entre cerveaux normaux et GBM.

Représentation de l'expression différentielle des gènes (représentés horizontalement) entre les échantillons (représentés verticalement) issus de cerveaux normaux (encadré de bleu) par rapport aux GBM (surexpression en rouge et sous-expression en vert) ($p < 0,00001$).

L'analyse non supervisée au sein des échantillons de GBM n'a pas permis de mettre en évidence des classes robustes d'expression de GBM. En effet les classes d'expressions des gènes sont différentes selon deux méthodes différentes de partitionnement k means et PAM, sans aucune tendance de regroupement.

De plus, la différence de survie entre ces 2 ou 3 classes de GBM retrouvées par la méthode de k-means n'est pas significative selon la méthode de Kaplan-Meier et le calcul du log-rank.

2.3.2. Modules de co-expression des gènes immuns

Nous avons appliqué l'algorithme WGCNA aux données de 161 GBM publiées par Lee et *al.* pour explorer les relations transcriptionnelles entre les gènes au sein des GBM et déterminer des modules de gènes co-exprimés. Six modules ont été définis par l'analyse de réseaux de co-expression ou co-expression network des gènes. Afin de les différencier, chaque module est associé à une couleur (Cf. Tableau 4). Chaque module contient des gènes d'expression coordonnés entre eux et potentiellement impliqués dans des processus cellulaires communs.

Pour inférer le(s) processus, type(s) cellulaire(s) ou la (les) fonction(s) associée(s), nous avons analysé l'enrichissement fonctionnel de chaque module. En pratique, nous avons considéré l'ensemble des mots clés fonctionnels associé aux gènes d'un même module et recherché les mots clés significativement plus représentés (enrichis) dans chaque module.

Nous avons appelé les différents modules de gènes immuns selon leur(s) fonction(s) après l'enrichissement fonctionnel : cellules NK et immunité innée (module bleu), cytokines et molécules de complexe d'histocompatibilité (module jaune), signalisation cellulaire et lectines (module marron), activation cellulaire et apoptose (module vert), cellules myéloïdes (module turquoise) et régulation de la réponse immune (module rouge) (Cf. Tableau 4).

Module	Gènes associés	Annotations associées au module
Immunité innée & cellules NK	NCR1 PGLYRP4 PLUNC IL1RAPL2 KIR2DS1	Réponse défense Récepteur de molécule CMH I Récepteur « Ig like » cellule NK Cytotoxicité médiée par NK
Cytokines & CMH de classe I	CSF2RA LILRB1 ICAM1 LILRA3 TNFRSF10C	Activité des récepteurs de cytokines liaisons cytokine Voie signalisation médiée par cytokine et chimiokine Communication cellulaire
Cellules myéloïdes	KYNU LCP2 PTGER4 FCGR2A CLEC4A	Globules blancs et monocytes Activation leucocytaire Réponse au stimulus Immunité médiée par Macrophage
Signalisation cellulaire & lectines	CD200 BCL11A LILRB3 ERBB4 FGF9	Récepteur de surface cellulaire Transduction du signal Facteur de croissance: Heparin-binding et fibroblaste
Activation cellulaire & apoptose	UBE2N MALT1 MIA3 ADAM17 CEBPG	Activation leucocytaire Réponse au stress Régulation de l'apoptose Régulation positive de la prolifération cellulaire
Régulation de la réponse immune	CSF1 SBNO2 CLPTM1 NOTCH2 BCL6	Régulation de différenciation cellulaire Régulation de la réponse de défense Régulation positive de la différenciation des cellules myéloïdes Régulation de prolifération cellulaire

Tableau 4 : modules de co-expression et annotations fonctionnelles.

Les gènes immuns ont été analysés par une étude des réseaux de co-expression, qui a défini 6 modules distincts. Les annotations enrichies dans chaque module ont défini une ou plusieurs fonction(s) ou un type(s) cellulaire(s) qui les représente le mieux : cellules NK et immunité innée (module bleu), cytokines et molécules de complexe d'histocompatibilité (module jaune), signalisation cellulaire et lectines (module marron), activation cellulaire et apoptose (module vert), cellules myéloïdes (module turquoise) et régulation de la réponse immune (module rouge). Les gènes les plus associés à chaque module sont décrits dans la 2^{ème} colonne et les annotations sont rapportées après enrichissement fonctionnel de chaque module dans la 3^{ème} colonne.

Après analyse de la survie, cinq des six modules contiennent des gènes dont l'expression a un impact sur la survie globale. Seul le module rouge ne contient pas de gène significativement associé à la survie globale.

Après analyse de l'annotation, deux modules sont significativement enrichis en gènes associés à la survie globale: le module bleu (signature cellules NK et immunité innée) et le module jaune (signature cytokines et molécules de complexe d'histocompatibilité) ($p=0.008$ et $p=0.01$, respectivement) (Cf. Tableau 5). Dans le tableau 5, chaque module est représenté par la fonction principale du module après annotation fonctionnelle dans la 1^{ère} colonne, par les 5 gènes les plus associés à la survie dans la 2^{ème} colonne avec la valeur de la p-value de ces 5 gènes dans la 3^{ème} colonne. Les annotations fonctionnelles de tous les gènes associés à la survie de chaque module sont rapportées dans la 4^{ème} colonne avec la valeur de la p-value de cette annotation dans la 5^{ème} colonne.

Module	Gènes associés à la survie	p-value gènes	Annotations fonctionnelles	p-value annotations
Immunité innée & cellules NK	IFNA1 LCK CDK6 KLRD1 KIR3DL1	1,82E-03 1,23E-02 1,59E-02 1,73E-02 1,82E-02	Immunité médiée par NK Immunité et défense Cytotoxicité médiée par NK Récepteur NK CMH1	4,31E-08 1,32E-07 4,73E-07 6,67E-06
Cytokines & CMH de classe I	NGFR HLA-G SBNO2 HLA-C HLA-B	3,43E-06 6,77E-03 7,67E-03 7,89E-03 1,81E-02	Présentation Ag et processing Ag CMH classe I Ag associé CMH classe I Reconnaissance Ag CMH I	3,50E-08 2,50E-06 4,40E-06 2,50E-05
Cellules myéloïdes	LYN RPS19 XBP1 HIF1A ADAM9	5,26E-04 9,45E-04 2,32E-03 3,54E-03 3,62E-03	Réponse au stimulus Réponse inflammatoire Activation leucocyte myéloïde Monocytes	5,00E-07 2,70E-05 1,30E-04 1,00E-03
Signalisation Cellulaire & lectines	CDC42 CD200 CLEC16A MAG HIF1AN	7,65E-04 1,83E-03 3,05E-03 7,49E-03 8,61E-03	Régulation cellulaire Liaison carbohydre Liaison sucre Lectine de type C	1,85E-02 4,83E-03 3,78E-03 7,86E-03
Activation Cellulaire & apoptose	CD164 CEBPG TMX1 DPP4 CNIH	9,47E-03 1,36E-02 2,02E-02 2,40E-02 4,02E-02	Réponse au stimulus Activation leucocytaire Activation cellulaire Réponse au stress	NS NS NS NS
Régulation de la réponse immune	Aucun gène significatif			

Tableau 5 : modules de co-expression et enrichissement en gènes pronostiques.

Chaque module de co-expression est défini par leur fonction associée (1^{ère} colonne) et associé à une couleur différente. Les 5 gènes les plus associés à la survie sont décrits dans la 2^{ème} colonne avec la p-value (3^{ème} colonne). Les annotations fonctionnelles de l'ensemble des gènes associés à la survie de chaque module sont notées dans la 4^{ème} colonne avec leur p-value dans la 5^{ème} colonne.

2.3.3. Analyses de survie

Différentes méthodes statistiques d'analyse de survie sont disponibles. Nous avons analysé l'ensemble des 791 gènes immuns, pour déterminer lesquels ont un impact sur la survie selon 3 méthodes statistiques différentes : la méthode de Cox pas à pas, la comparaison du 1^{er} par rapport au 4^{ème} quartile de survie des patients, et la méthode classique de Cox. Les résultats de ces différentes méthodes et notamment les gènes significatifs statistiquement et leurs sondes correspondantes seront rapportés dans les 3 tableaux de résultats suivants avec leur p-values.

La 1^{ère} méthode utilisée est la méthode d'analyse de Cox pas à pas, qui analyse gène par gène et gène après gène l'ensemble des gènes immuns. Cette analyse a mis en évidence 52 gènes avec un impact sur la survie globale ($p < 0,05$). Les gènes et leurs sondes correspondantes sont décrits dans la 1^{ère} et 2^{ème} colonne du tableau 6 avec leur p-value dans la dernière colonne.

Gène	Sonde	p value
CTSG	205653_at	<1,0E-4
PTCRA	211837_s_at	<1,0E-4
MNX1	214614_at	<1,0E-4
ULBP2	221291_at	<1,0E-4
ACVR2A	205327_s_at	<1,0E-4
KIR2DL4	208426_x_at	<1,0E-4
NCK1	211063_s_at	<1,0E-4
LTB4R	216388_s_at	<1,0E-4
KIR2DL1	208179_x_at	<1,0E-4
POU2F2	211771_s_at	<1,0E-4
PPARG	208510_s_at	<1,0E-4
ADIPOQ	207175_at	<1,0E-4
CCL17	207900_at	<1,0E-4
FGF17	221376_at	<1,0E-4
NOS2A	210037_s_at	<1,0E-4
TUBB3/2C	202154_x_at	<1,0E-4
HDAC9	205659_at	<1,0E-4
TPD52	201688_s_at	<1,0E-4
IL4	207539_s_at	<1,0E-4
FYN	216033_s_at	<1,0E-4
C5AR1	220088_at	<1,0E-4
VTCN1	219768_at	<1,0E-4
CDKN2A	211156_at	<1,0E-4
VEGFC	209946_at	<1,0E-4
HSP90AA1	211969_at	<1,0E-4
CD22/MAG	204581_at	<1,0E-4
SERPINB4	211906_s_at	<1,0E-4
KIR3DL3	216676_x_at	<1,0E-4
ICOSLG	213450_s_at	<1,0E-4
IGHD/IGHG1	215621_s_at	<1,0E-4
CD1E	215784_at	<1,0E-4
IL5	207952_at	<1,0E-4
DHRS2	214079_at	<1,0E-4
IGLL1	213502_x_at	<1,0E-4
TRIM10	210579_s_at	<1,0E-4
S1PR4	206437_at	<1,0E-4
CCR10	220565_at	<1,0E-4
MYST3	216361_s_at	<1,0E-4
ADAMDEC1	206134_at	<1,0E-4
ARG1	206177_s_at	<1,0E-4
HGF	210998_s_at	<1,0E-4
NCF1B	214084_x_at	<1,0E-4
TM7SF4	221266_s_at	<1,0E-4
CD19	206398_s_at	<1,0E-4
CXCR4	217028_at	2,0E-4
INHBA	210511_s_at	4,0E-4
FCAR=CD89	211307_s_at	6,0E-4
CCL15	210390_s_at	9,0E-4
CLEC10A	206682_at	1,4E-3
CXCL11	211122_s_at	2,0E-3
PML	211013_x_at	2,45E-3
GPR183=EBI2	205419_at	3,62 E-3

Tableau 6 : analyse de Cox pas à pas.

Les 52 gènes (1^{ère} colonne) et leurs sondes correspondantes (2^{ème} colonne) associés à la survie selon la méthode du Cox pas à pas sont rapportés dans ce tableau avec leur p-value dans la 3^{ème} colonne.

La 2^{ème} méthode consiste en l'analyse des différences d'expression des gènes, entre le 1^{er} et le 4^{ème} quartile de survie des patients. Elle met en évidence 46 gènes différentiellement exprimés de manière significative.

Gène	Sonde	p-value
MAP4K2	204936_at	<1,0E-4
BMPR1A	213578_at	<1,0E-4
CD22/MAG	204581_at	<1,0E-4
NCK1	211063_s_at	<1,0E-4
EDNRB	204271_s_at	<1,0E-4
ZEB1	212758_s_at	<1,0E-4
ACVR2A	205327_s_at	1,53E-4
TNFRSF25	211841_s_at	1,65E-4
RPS19	213414_s_at	3,87E-4
CARTPT	206339_at	4,65E-4
CRHR1	214619_at	5,94E-4
PDGFC	218718_at	1,14E-3
HIF1A	200989_at	1,46E-3
CD70	206508_at	1,86E-3
CALCA	217495_x_at	1,87E-3
PML	211588_s_at	1,92E-3
ARG1	206177_s_at	1,99E-3
ULBP2	221291_at	2,44E-3
SCYE1	202541_at	2,53E-3
TAPBP	210294_at	2,54E-3
RBP4	219140_s_at	2,78E-3
CD247	210031_at	3,34E-3
FGF2	204422_s_at	3,39E-3
IL6ST	204863_s_at	3,77E-3
IL21R	221658_s_at	3,89E-3
BNIP3L	221478_at	3,95E-3
MET	203510_at	4,22E-3
MNX1	214614_at	4,88E-3
TNFRSF6B	206092_x_at	5,32E-3
JAG2	209784_s_at	5,33E-3
LDB1	35160_at	5,53E-3
IL5	207952_at	5,60E-3
CCL17	207900_at	5,79E-3
IGSF6	206420_at	6,12E-3
MS4A1	217418_x_at	6,27E-3
TGFB1	203084_at	6,74E-3
ERAP1	214012_at	6,89E-3
RPS14	208645_s_at	7,73E-3
TNFSF12/ TNFSF13	205611_at	8,34E-3
FGF12	214589_at	8,49E-3
IKBKG	36004_at	8,49E-3
HMGB1	200679_x_at	9,37E-3
CD79B	205297_s_at	9,43E-3
C1QBP	214214_s_at	9,47E-3
IL33	209821_at	9,55E-3
FCGR1B/ FCGR1C	214511_x_at	9,67E-3

Tableau 7 : analyse du 1^{er} versus le 4^{ème} quartile.

L'analyse du 1^{er} et 4^{ème} quartile met en évidence 46 gènes (1^{ère} colonne) et leurs sondes correspondantes (2^{ème} colonne) ayant un impact significatif sur la survie (p-value dans la dernière colonne).

La 3^{ème} méthode d'analyse de survie correspond à l'analyse selon la méthode classique décrite par **Cox**. Elle calcule un z-score et elle a mis en évidence **28 gènes** associés à la survie (Cf. Tableau 8).

Gène	Sonde	Z score	p-value
MNX1	214614_at	3,53908049	4,0E-4
CX3CL1	203687_at; 823_at	-3,37424902	7,4E-4
BCL11A	219497_s_at	3,29719206	9,8E-4
ACVR2A	205327_s_at	3,21595546	1,3E-3
CX3CR1	205898_at	-3,17468106	1,5E-3
CSF1	209716_at; 207082_at; 211839_s_at	-3,15958263	1,6E-3
CSF1R	203104_at	-3,13586297	1,7E-3
PDGFC	218718_at	-3,05093065	2,3E-3
FGFR2	208225_at	2,91274758	3,6E-3
BLNK	207655_s_at	-2,90463999	3,7E-3
CD22/MAG	204581_at	2,89668148	3,8E-3
SMAD3	218284_at	-2,88240998	3,9E-3
CHIT1	208168_s_at	2,8499773	4,4E-3
LYN	210754_s_at; 202625_at	-2,83255808	4,6E-3
CSF2RA	210340_s_at	-2,83012098	4,7E-3
FGF2	204422_s_at	-2,81572319	4,9E-3
IL1B	205067_at	-2,80151765	5,1E-3
EXOSC9	205061_s_at	2,74840052	6,0E-3
CCBP2	206887_at	-2,68676792	7,2E-3
EDNRB	204271_s_at; 206701_x_at	-2,6877713	7,2E-3
IL6ST	212195_at	-2,68857265	7,2E-3
RELA	209878_s_at	-2,67692484	7,4E-3
IL21R	221658_s_at	-2,67025027	7,6E-3
CXADR	203917_at	2,66655747	7,7E-3
FCGRT	218831_s_at	-2,64595481	8,1E-3
TNFSF12	205611_at	-2,62573641	8,6E-3
CFP	206380_s_at	2,62418887	8,7E-3
FOXO3	217399_s_at	-2,61378728	9,0E-3

Tableau 8 : analyse des Z scores.

Les 28 gènes (1^{ère} colonne) et leurs sondes correspondantes (2^{ème} colonne) ayant un impact significatif sur la survie par la méthode de Cox sont rapportés dans ce tableau. Les valeurs de z-score des différents gènes sont également rapportées dans la 3^{ème} colonne et les p-values dans la dernière colonne.

Les valeurs de z-scores peuvent également être représentées selon un diagramme, les valeurs négatives à gauche et les valeurs positives à droite (Cf. Figure 10). Cette méthode est la seule des 3 méthodes précédentes permettant de décrire l'impact sur la survie de manière positive ou négative. En effet, 19 gènes ayant un impact pronostique positif dans notre analyse ont une valeur des z-scores négative : *FOXO3*, *TNFSF12*, *FCGRT*, *IL21R*, *RELA*, *CCBP2*, *DENRB*, *IL6ST*, *IL1B*, *FGF2*, *CSF2RA*, *LYN*, *SMAD3*, *BLNK*, *PDGFC*, *CSF1R*, *CSF1*, *CX3CR1* et *CX3CL1*. Les 9 gènes ayant un impact péjoratif sur la survie ont une valeur de z-score positive : *MNX1*, *BCL11A*, *ACVR2A*, *FGFR2*, *CD22*, *CHIT1*, *EXOSC9*, *CXADR* et *CFP*.

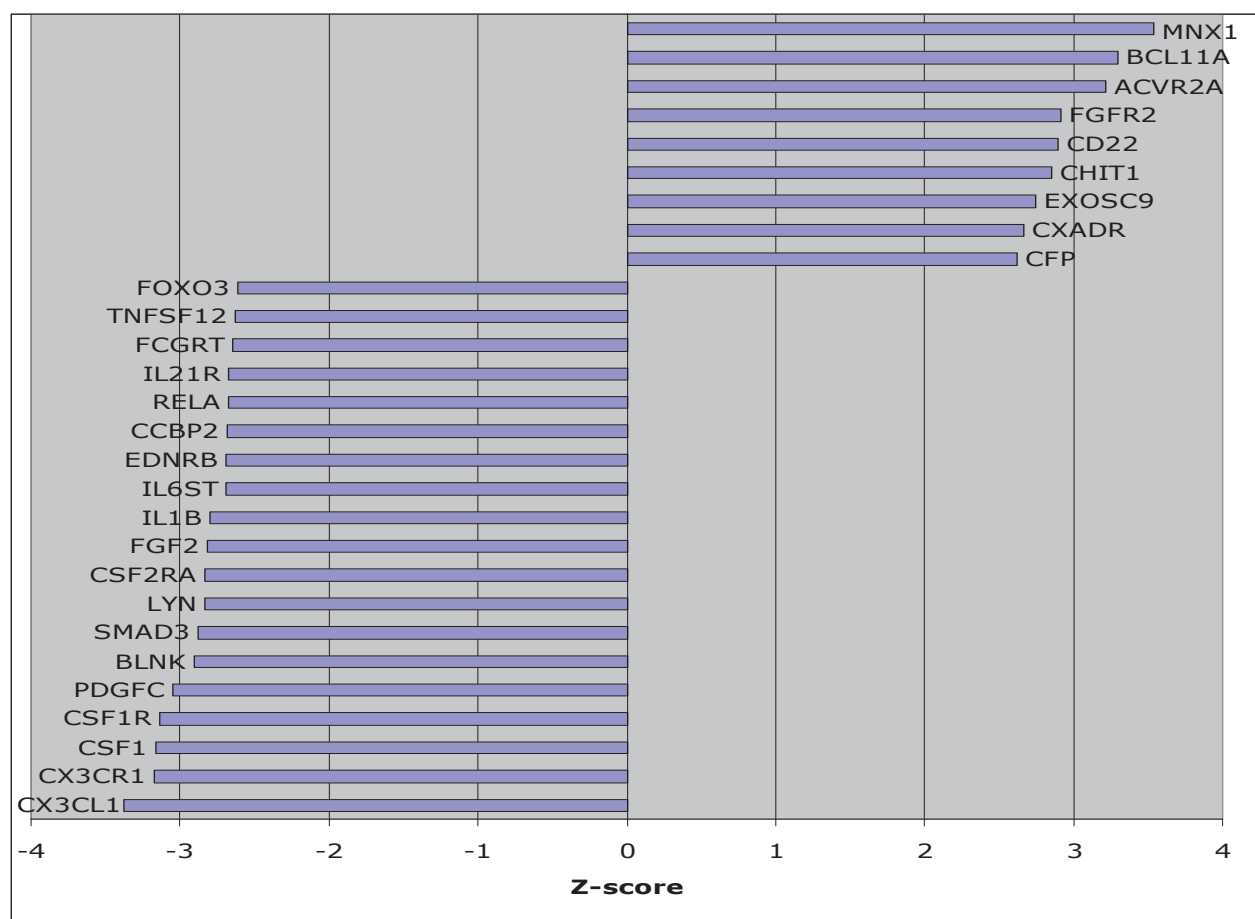


Figure 10 : représentation des Z scores des 28 gènes significatifs par la méthode de Cox.

Les 19 gènes ayant un impact pronostique positif ont une valeur négative des z-scores représentée à gauche, les 9 gènes ayant un impact péjoratif sur la survie ont une valeur de z-score positive représentée à droite.

Cent huit gènes ont un impact significatif en survie avec au moins une des 3 méthodes précédentes et les gènes communs sont décrits dans le diagramme de Venn (Cf. Figure 11).

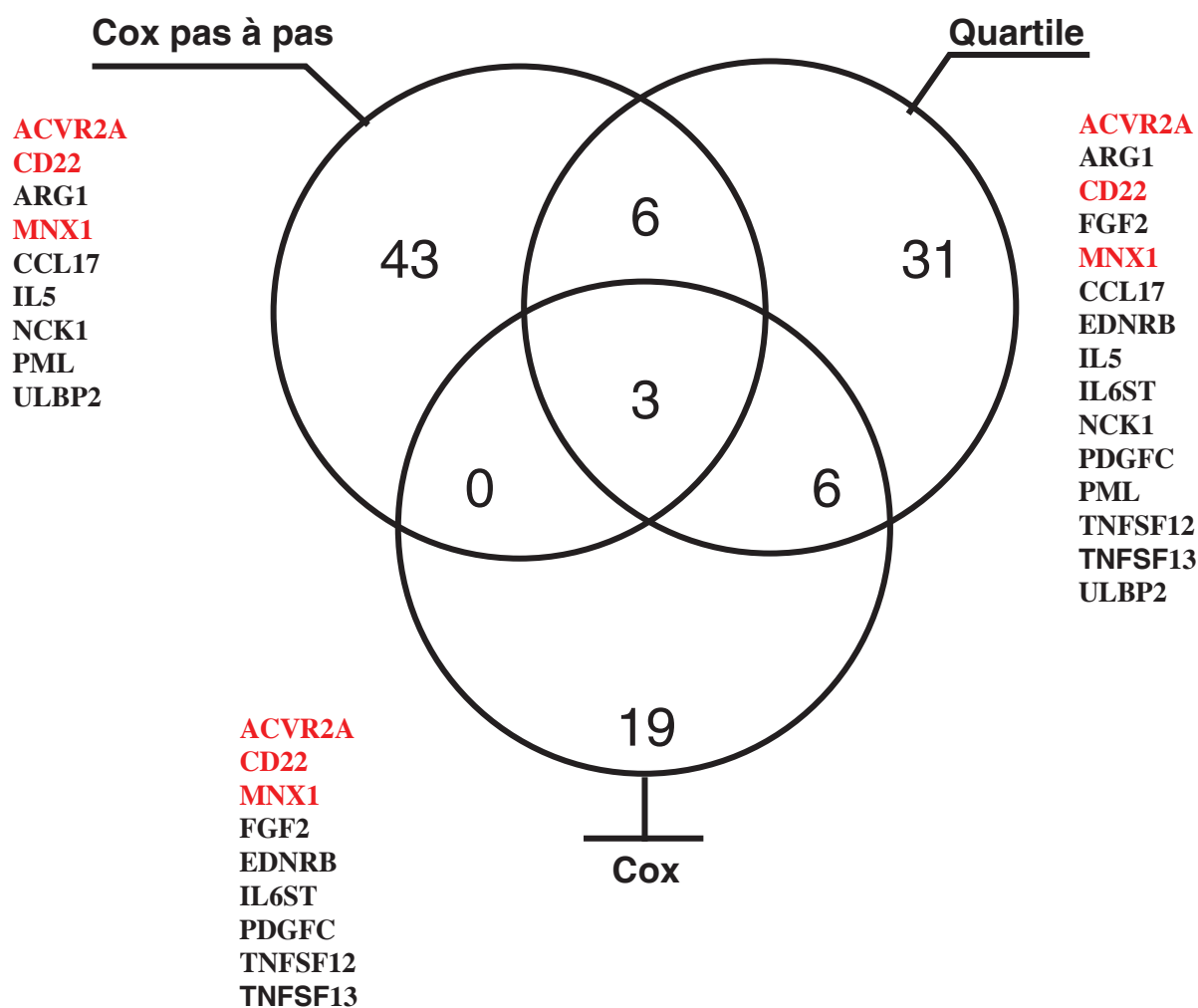


Figure 11 : diagramme de Venn des 3 méthodes statistiques et des gènes du risque.

Les différents gènes significatifs dans 2 méthodes d'analyse sont écrits en noir et les gènes communs à 3 méthodes en rouge. Le nombre de gènes significativement associés à la survie est noté dans les 3 cercles correspondant chacun à une méthode statistique. Trois gènes sont communs aux 3 méthodes et 12 communs à 2 méthodes sur les 108 gènes significatifs en survie.

2.3.4. Modèle mathématique de survie

Le modèle des gènes immuns est un modèle mathématique établi par le logiciel R, permettant de calculer la probabilité de survie à un temps t dans une cohorte donnée. Il a été construit à partir des gènes associés à la survie en utilisant la méthode décrite par de Tayrac, Aubry et *al.* (169). Il comporte 6 gènes immuns: *ACVR2A*, *CD22*, *MNX1*, *ARG1*, *RPS19*, *FGF2*. L'équation du score de risque est basée sur l'expression pondérée de ces 6 gènes selon la formule suivante : score du risque = $(0,744 \times CD22) + (2,109 \times ACVR2A) + (0,860 \times MNX1) + (-1,328 \times RPS19) + (-1,028 \times FGF2) + (0,913 \times ARG1)$. Le seuil du score fixé à 0,30, stratifie de manière optimale la cohorte d'entraînement en fonction de la survie globale ($p=4E-13$).

Quatre gènes ont un mauvais pronostic : *ACVR2A*, *CD22*, *MNX1*, *ARG1* et 2 gènes un bon pronostic : *RPS19* et *FGF2*. Les z-scores des gènes significatifs selon la méthode de Cox sont concordants : *FGF2* a un impact pronostique positif, *MNX1*, *ACVR2A* et *CD22* ont des impacts péjoratifs sur la survie. *ACVR2A*, *CD22*, *MNX1* sont retrouvés significatifs dans 3 méthodes, *ARG1* et *FGF2* dans 2 méthodes, et *RPS19* retrouvé dans la méthode des quartiles.

Les gènes du risque sont retrouvés dans tous les 5 modules de co-expression enrichis en gènes ayant un impact sur la survie. *ACVR2A* appartient au module bleu (NK et immunité innée), *ARG1* appartient au module jaune (cytokines et CMH), *RPS19* appartient au module turquoise (cellules myéloïdes), *CD22*, *MNX1* appartiennent au module marron (transduction du signal et lectines) et *FGF2* appartient au module vert (activation cellulaire et apoptose). Ce qui témoigne de leur potentielle indépendance fonctionnelle. Aucun des 6 gènes du modèle de risque n'appartient au module rouge. Par ailleurs, *MNX1* et *RPS19* font partie des 27 gènes associés individuellement à la survie dans l'analyse de co-expression.

A partir de ce modèle de risque, les patients des différentes cohortes de validation ont été classés en haut ou bas risque en fonction du score obtenu avec cette équation mathématique. Nous avons donc ensuite comparé les courbes de survie des patients ayant un bas risque (en bleu) versus un haut risque (en rouge) selon la méthode de Kaplan-Meier avec une p-value calculée selon le test du log-rank.

La stratification sur la cohorte d'entraînement du risque avec un seuil de 0,30 a donc identifié deux groupes de patients avec une différence statistiquement significative de survie globale ($p=4E-13$). Le groupe de bas risque ($n=66$) a une survie médiane de 22,3 mois, le groupe de haut risque ($n=49$) a une médiane de survie globale de 7,3 mois (Cf. Figure 12).

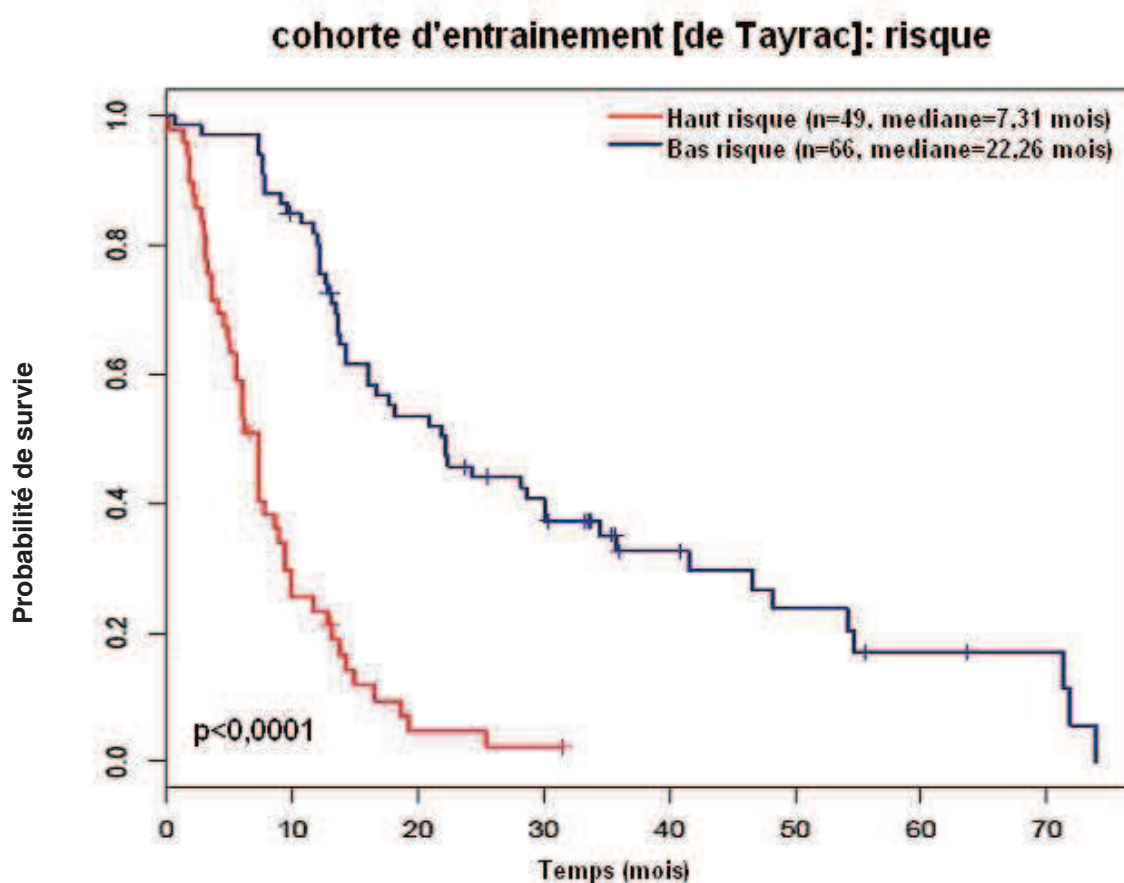


Figure 12 : courbe de survie en fonction du risque sur le jeu d'entraînement publié par de Tayrac (n=115 GBM).

La courbe de survie selon Kaplan-Meier des patients à haut risque ($n=49$, médiane de survie à 7,3 mois) est représentée en rouge, celle des patients à bas risque en bleu ($n=66$, médiane de survie à 22,3 mois).

La stratification de la cohorte de validation (publiée par Petalidis et *al.*) au seuil du score de risque à 0,30 a identifié deux groupes de patients avec une différence significative de survie globale ($p < 0,00012$). Le groupe de bas risque ($n = 18$) a une survie médiane de 12 mois, le groupe de haut risque ($n = 21$) a une médiane de survie globale de 6 mois (Cf. Figure 13).

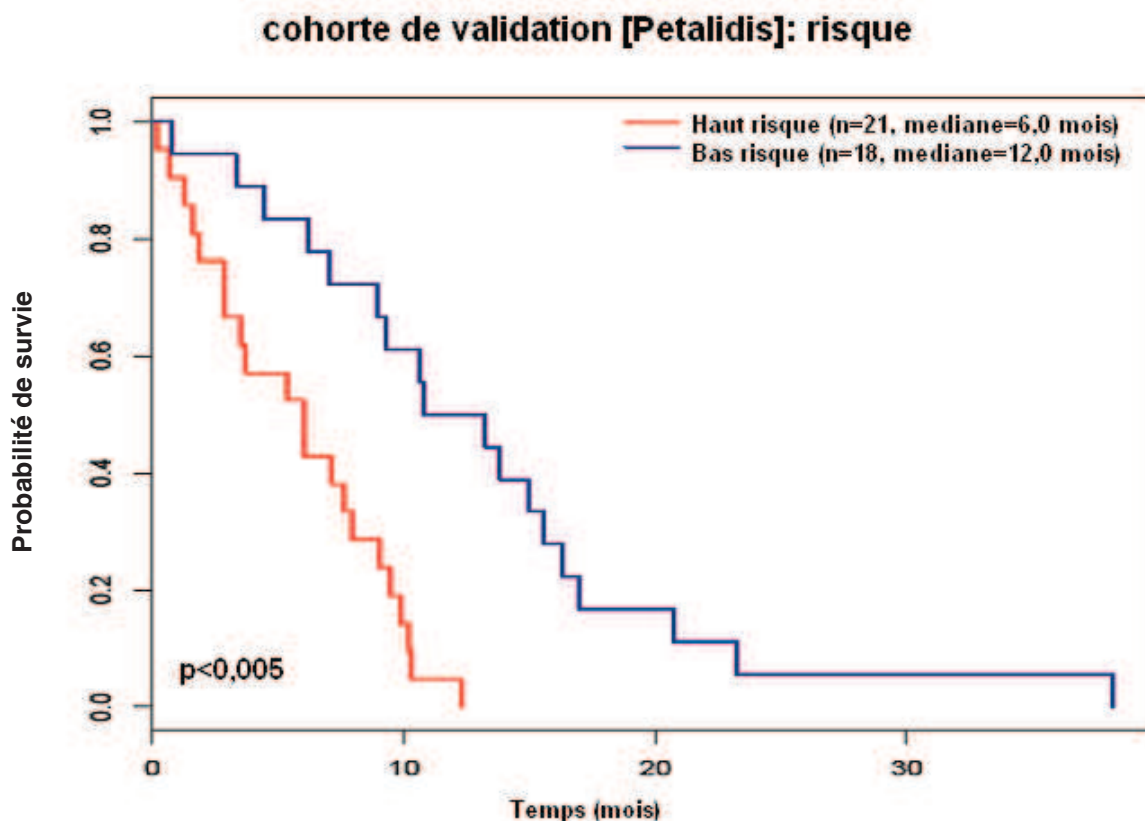


Figure 13 : courbe de survie en fonction du risque sur le jeu de validation publié par Petalidis (n=39 GBM).

La courbe de survie selon Kaplan-Meier des patients à haut risque ($n=21$, médiane de survie à 6 mois) est représentée en rouge, celle des patients à bas risque en bleu ($n=18$, médiane de survie à 12 mois).

Le modèle de risque à 6 gènes a donc été établi sur une cohorte d'entraînement et il a été validé sur une cohorte de validation. Nous avons confirmé **ce modèle de risque** sur 4 autres cohortes : deux publiées dans la littérature et deux autres locales.

2.3.5. Validation du modèle de risque à 6 gènes immuns

Nous avons étudié la robustesse de notre modèle sur 2 autres études publiées par Lee et *al.* et Verhaak et *al.* accessibles dans la littérature. Ces deux jeux de données regroupent les résultats d'expression de biopuces Affymetrix (147;165).

Ce prédicteur à 6 gènes permet d'identifier à nouveau 2 groupes de patients avec une différence de survie globale significative. La médiane de survie des patients à haut risque (n=87) est de 11,7 mois versus 18,5 mois pour les patients à bas risque (n=74) dans la cohorte GSE13041 ($p<0,001$) (Cf. Figure 14).

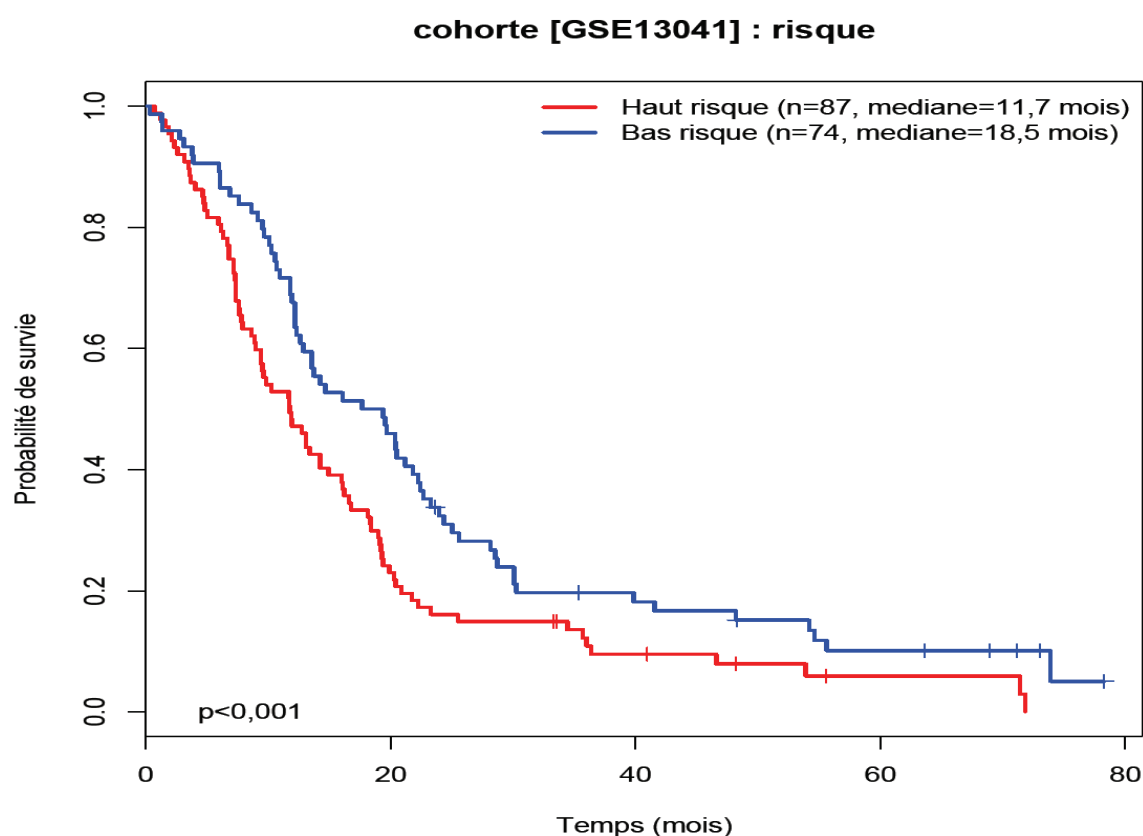


Figure 14 : courbe de survie en fonction du risque sur le jeu publié par Lee (n=161 GBM).

La courbe de survie selon Kaplan-Meier des patients à haut risque (n=87, médiane de survie à 11,7 mois) est représentée en rouge, celle des patients à bas risque en bleu (n=74, médiane de survie à 18,5 mois).

Dans la cohorte du TCGA, la médiane de survie des patients à haut risque (n=50) est de 7,7 mois versus 12,4 mois pour les patients à bas risque (n=123) ($p<0,01$) (Cf. Figure 15).

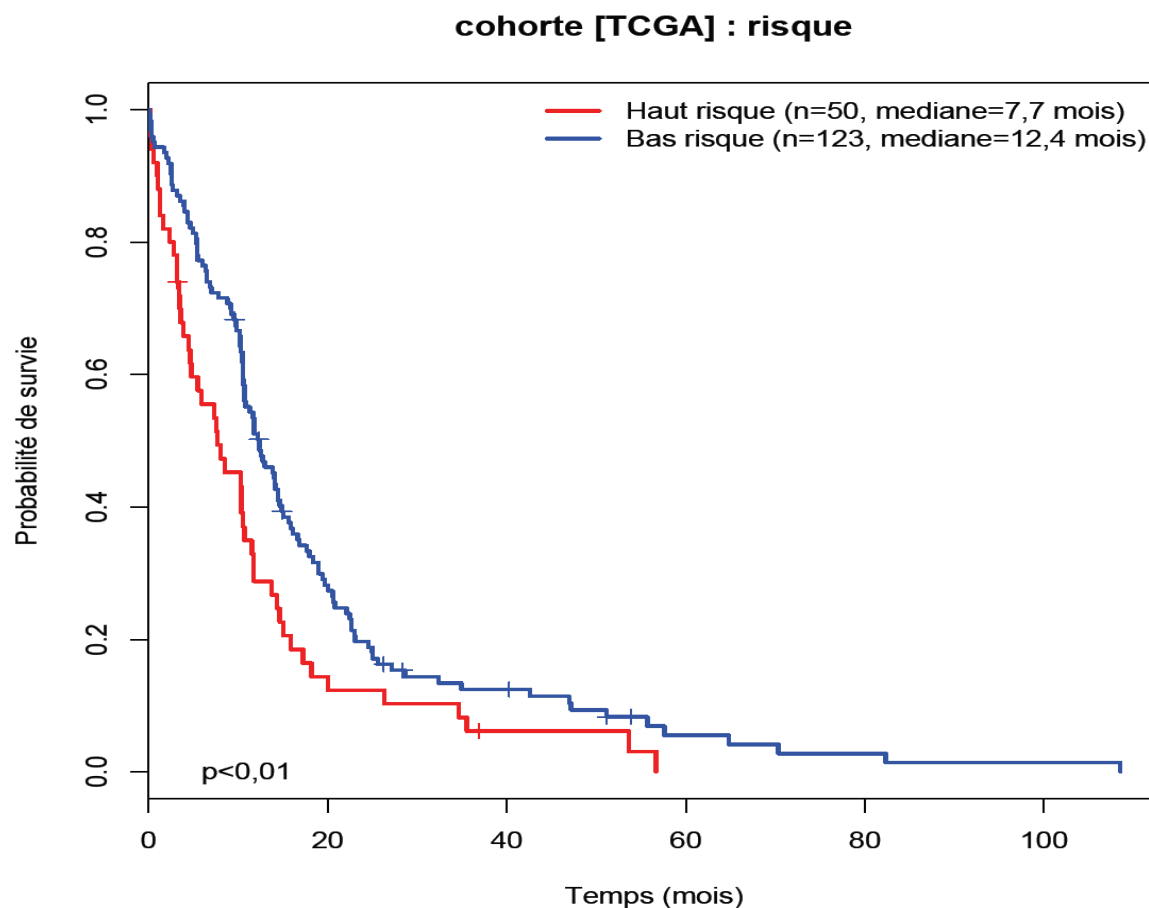


Figure 15 : courbe de survie en fonction du risque sur le jeu publié par Verhaak (n=173 GBM).

La courbe de survie selon Kaplan-Meier des patients à haut risque (n=50, médiane de survie à 7,7 mois) est représentée en rouge, celle des patients à bas risque en bleu (n=123, médiane de survie à 12,4 mois).

Nous avons ensuite validé ce modèle de risque à 6 gènes immuns sur deux cohortes locales de GBM.

La 1^{ère} cohorte locale est constituée de 41 GBM et TGNM, dont l'expression des gènes est analysée sur puces Agilent. La médiane des patients à haut risque est de 9,3 mois (n=17) versus 19,3 mois pour les patients à bas risque (n=24) ($p<0,01$) (Cf. Figure 16).

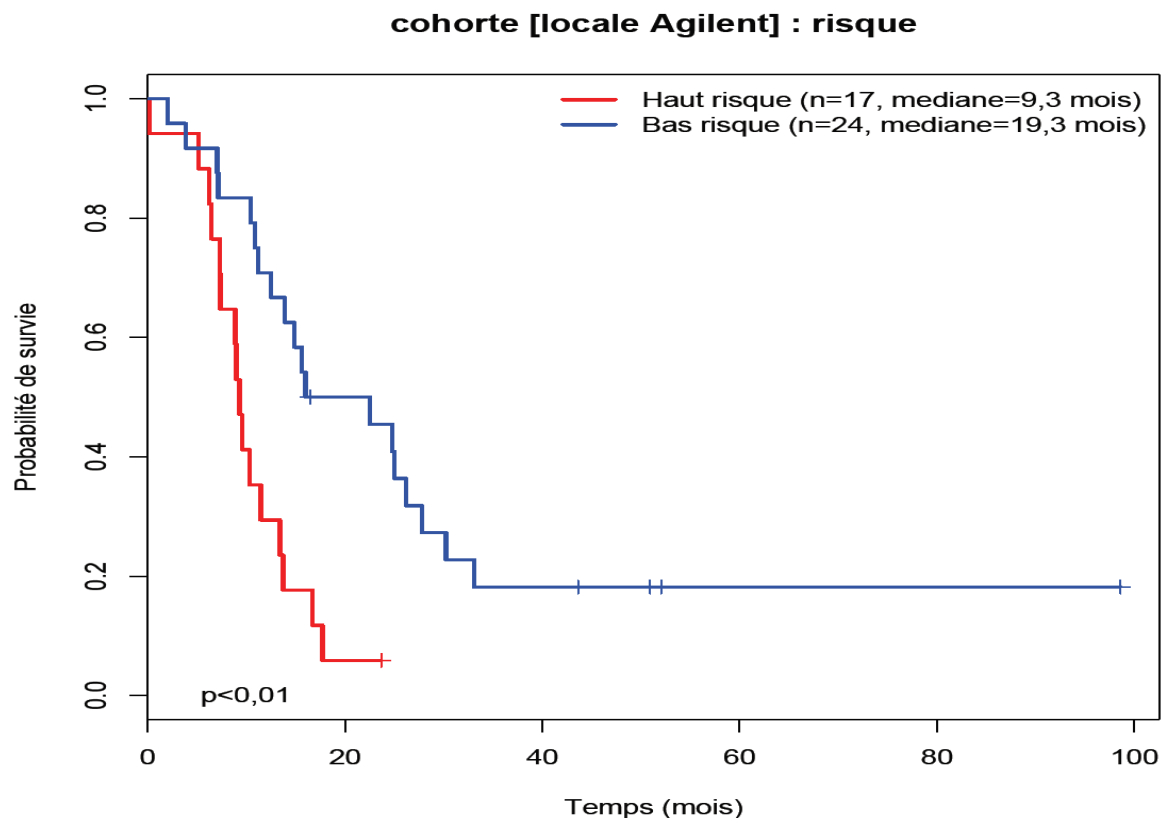


Figure 16 : courbe de survie en fonction du risque sur la cohorte locale Agilent (n=41 GBM).

La courbe de survie selon Kaplan-Meier des patients à haut risque (n=17, médiane de survie à 9,3 mois) est représentée en rouge, celle des patients à bas risque en bleu (n=24, médiane de survie à 19,3 mois).

Enfin, nous avons étudié ce modèle de risque sur une population locale de 57 GBM traités de manière homogène par le traitement standard, le protocole publié par Stupp. Cette validation du modèle de risque a été faite en utilisant une autre technique simple d'utilisation, la RT-Q PCR, pour mesurer l'expression des transcrits des 6 gènes.

Le risque à 6 gènes sépare également 2 sous-groupes pronostiques. La médiane de survie des patients à haut risque (n=7) est 13,9 mois versus 18,5 mois pour les patients de bas risque (n=50), avec une différence statistiquement significative (Cf. Figure 17).

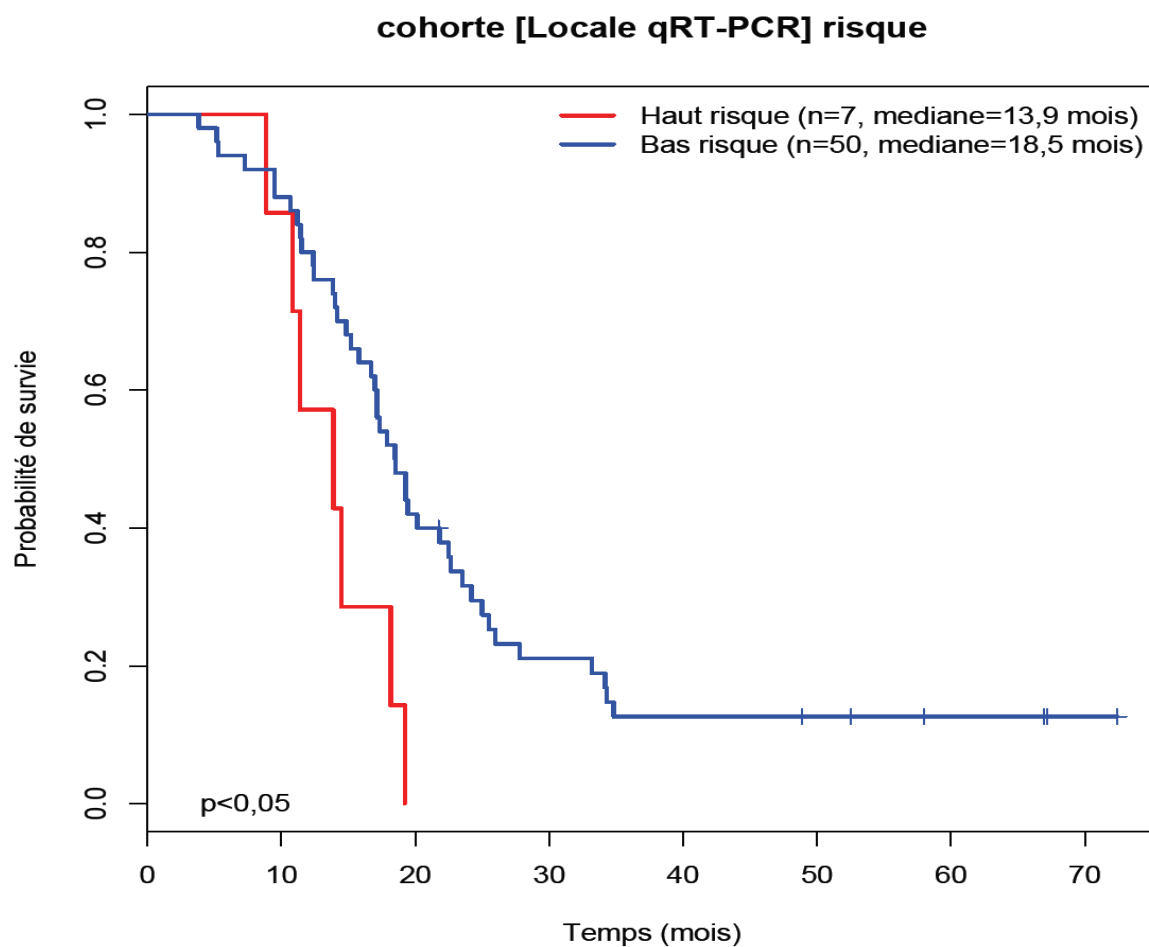


Figure 17 : courbe de survie en fonction du risque sur la cohorte locale par RT-PCR (n=57 GBM).

La courbe de survie selon Kaplan-Meier des patients à haut risque (n=7, médiane de survie à 13,9 mois) est représentée en rouge, celle des patients à bas risque en bleu (n=50, médiane de survie à 18,5 mois).

2.3.6. Modèle de risque à 6 gènes et statut du promoteur de *MGMT*

Le statut de méthylation de *MGMT* étant un facteur prédictif reconnu de la réponse à la chimiothérapie par témozolomide, nous l'avons donc pris en compte dans l'évaluation des performances de notre modèle de risque.

Une analyse univariée des données de la méta-analyse publiée par de Tayrac et *al.* a retrouvé comme facteurs associés à la survie globale : le statut de méthylation de *MGMT* et le risque à 6 gènes. Le sexe, l'histologie, l'âge et l'index de performance status selon KPS sont des facteurs qui ne sont pas statistiquement associés à la survie. En analyse multivariée, le statut de méthylation de *MGMT* et le risque à 6 gènes restent significatifs ($p=0.02$ and $p=0.01$, respectivement).

Dans le sous-groupe de bon pronostic, défini par la méthylation du promoteur du gène de la *MGMT*, le risque à 6 gènes permet toujours de séparer les patients en 2 sous-groupes pronostiques statistiquement différents dans 3 des cohortes de validation. Le statut de *MGMT* méthylé sera représenté en pointillé et le statut non méthylé en trait plein sur les courbes de survie.

Dans la cohorte GSE13041, les 86 patients ayant un GBM dont le promoteur de *MGMT* méthylé sont séparés de manière significative selon le risque à 6 gènes en un groupe de bas risque ($n=39$) avec une médiane de survie de 21,2 mois versus un groupe de haut risque ($n=47$) avec une médiane de 13,1 mois. Dans cette cohorte GSE 13041, les 75 patients ayant un GBM dont le promoteur de *MGMT* est non méthylé ont une médiane de survie de 11,9 mois (Cf. Figure 18).

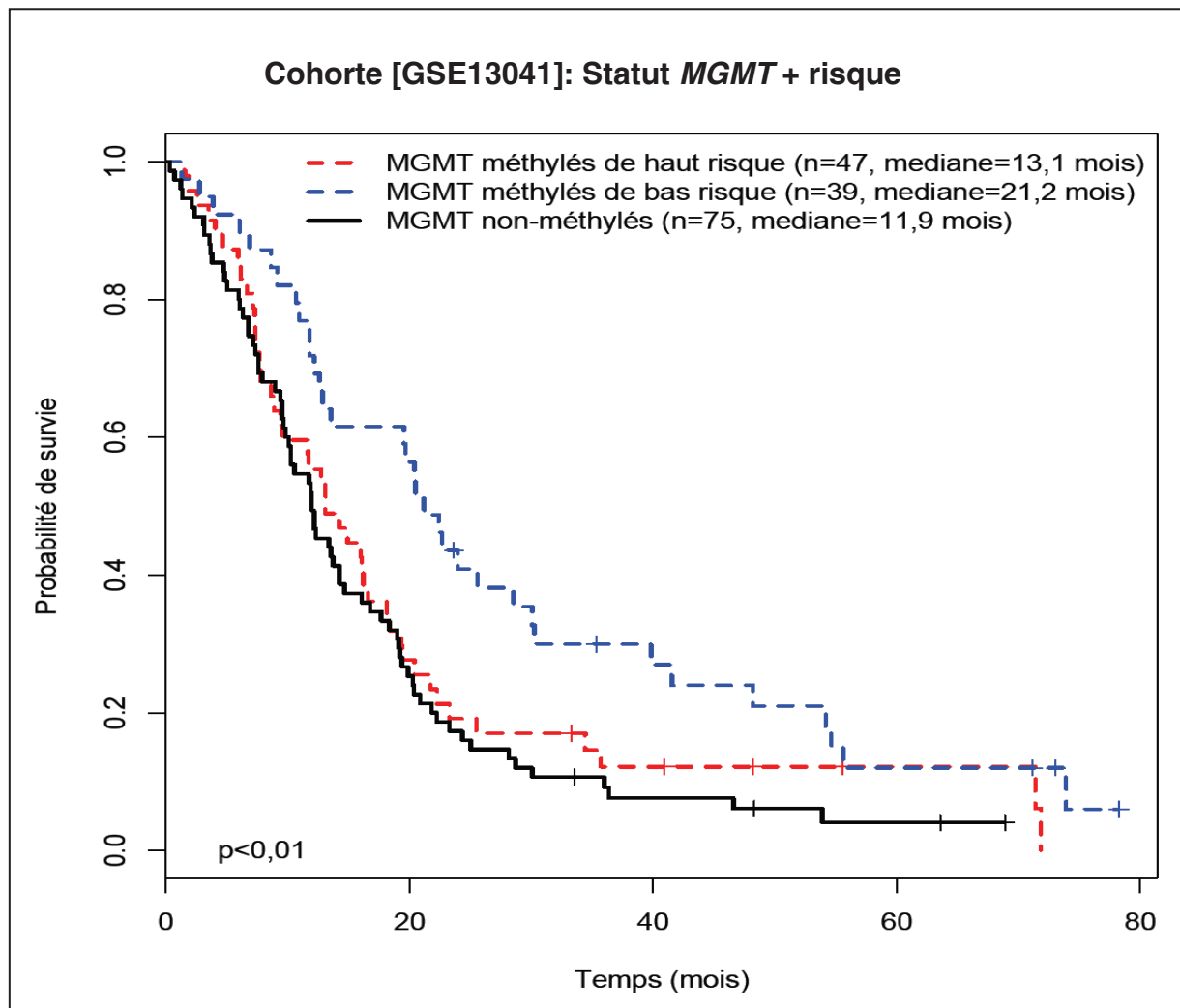


Figure 18 : courbe de survie en fonction du risque et du statut *MGMT* sur le jeu publié par Lee (n=161 GBM).

La courbe de survie selon Kaplan-Meier des patients à haut risque avec un statut *MGMT* méthylé (n=47, médiane de survie à 13,1 mois) est représentée en rouge pointillé, celle des patients à bas risque avec un statut *MGMT* méthylé en bleu pointillé (n=39, médiane de survie à 21,2 mois) et celle des patients ayant un statut *MGMT* non méthylé en noir en trait plein (n=75, médiane de survie à 11,9 mois).

Dans notre cohorte locale de 41 GBM et TGNM, le risque à 6 gènes sépare également le sous-groupe de bon pronostic (promoteur de *MGMT* méthylé) de manière significative. La médiane de survie des patients ayant un statut méthylé de *MGMT* de bas risque est de 25 mois (n=16) versus 8,1 mois (n=8) pour les hauts risques. La médiane de survie des 17 patients ayant un promoteur de *MGMT* non méthylé est de 10,4 mois (Cf.Figure 19).

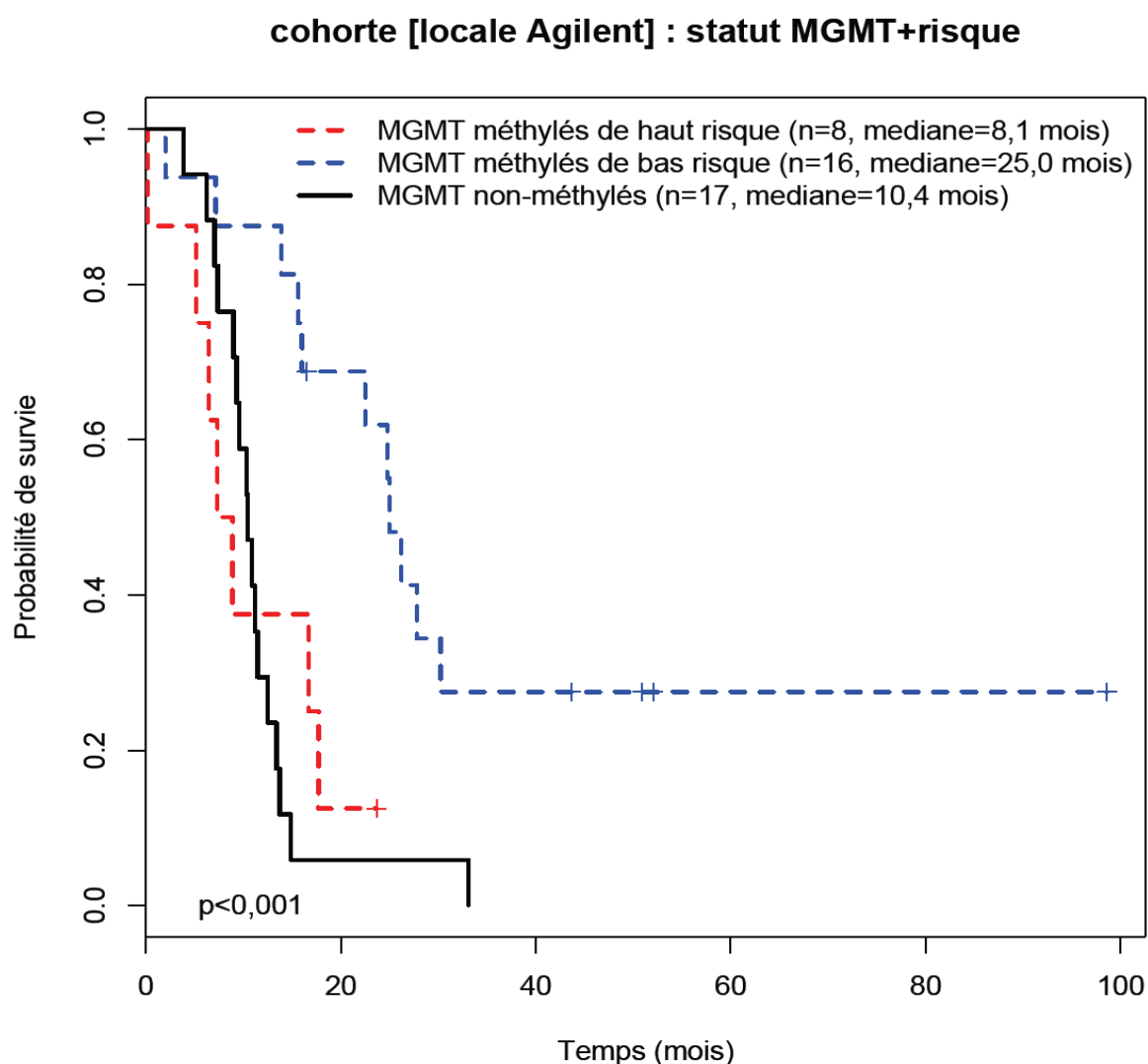


Figure 19 : courbe de survie en fonction du risque et du statut *MGMT* sur la cohorte locale Agilent (n=41 GBM).

La courbe de survie selon Kaplan-Meier des patients à haut risque avec un statut *MGMT* méthylé (n=8, médiane de survie à 8,1 mois) est représentée en rouge pointillé, celle des patients à bas risque avec un statut *MGMT* méthylé en bleu pointillé (n=16, médiane de survie à 25 mois) et celle des patients ayant un statut *MGMT* non méthylé en noir en trait plein (n=17, médiane de survie à 10,4 mois).

Pour les 56 patients de notre cohorte de RT-Q-PCR, comprenant les GBM traités de manière standard, dont le statut de *MGMT* est connu, seul ce statut et le risque à 6 gènes sont statistiquement significatifs en analyse univariée et multivariée ($p=0,045$ et $p=0,036$ respectivement).

Les 22 patients ayant une méthylation du promoteur de *MGMT* sont séparés en 2 sous groupes : bas risque ($n=19$) avec une médiane de survie de 21,8 mois versus haut risque ($n=3$) avec une médiane de 13,9 mois de manière significative bien que l'effectif soit faible dans le groupe à haut risque. Les 34 patients ayant un promoteur de *MGMT* non méthylé ont une survie médiane de 17,1 mois (Cf. Figure 20).

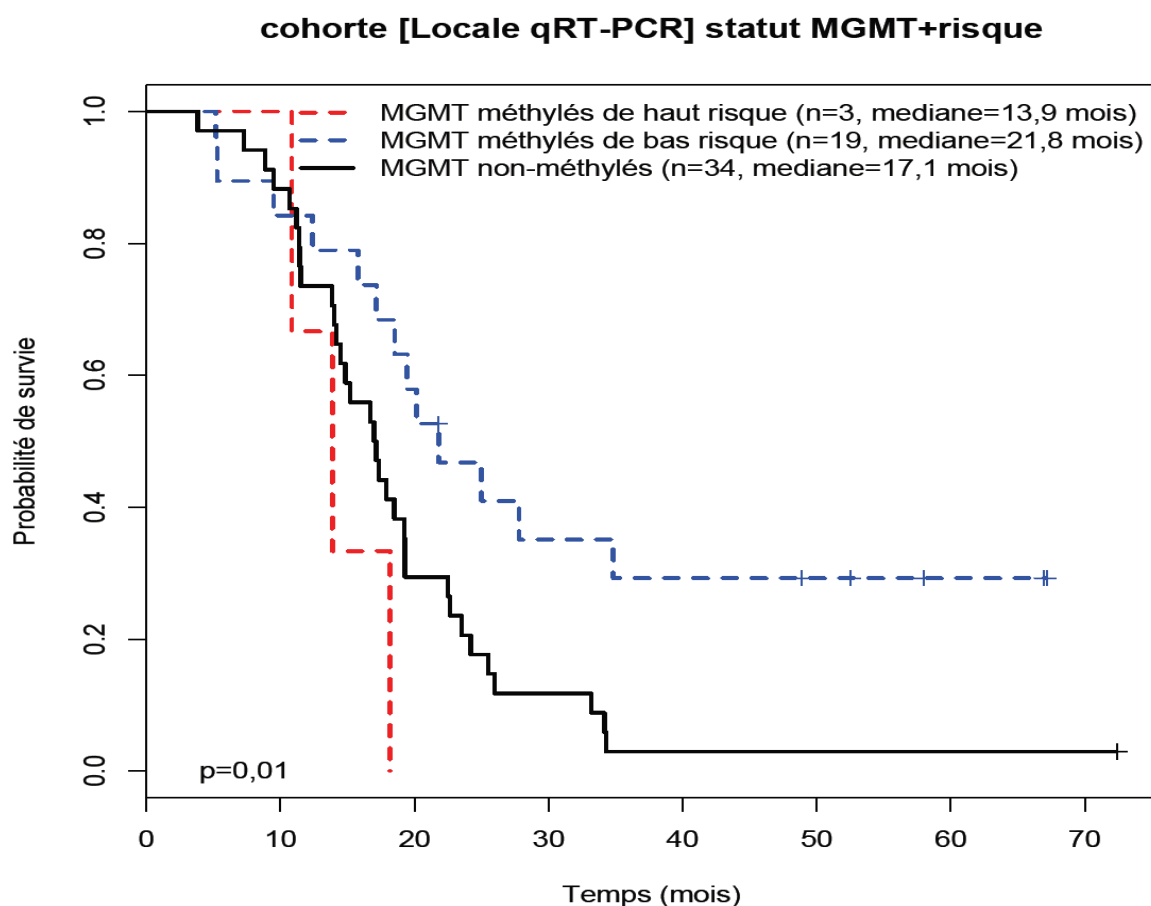


Figure 20 : courbe de survie en fonction du risque et du statut *MGMT* sur la cohorte locale par RT-Q PCR ($n=56$ GBM).

La courbe de survie selon Kaplan-Meier des patients à haut risque avec un statut *MGMT* méthylé ($n=3$, médiane de survie à 13,9 mois) est représentée en rouge pointillé, celle des patients à bas risque avec un statut *MGMT* méthylé en bleu pointillé ($n=19$, médiane de survie à 21,8 mois) et celle des patients ayant un statut *MGMT* non méthylé en noir en trait plein ($n=34$, médiane de survie à 17,1 mois).

Contrairement aux 3 précédentes cohortes, dans la cohorte du TCGA, le risque à 6 gènes ne permet pas de séparer significativement les groupes de bon pronostic avec un promoteur de *MGMT* méthylé (n=44) (Cf. Figure 21).

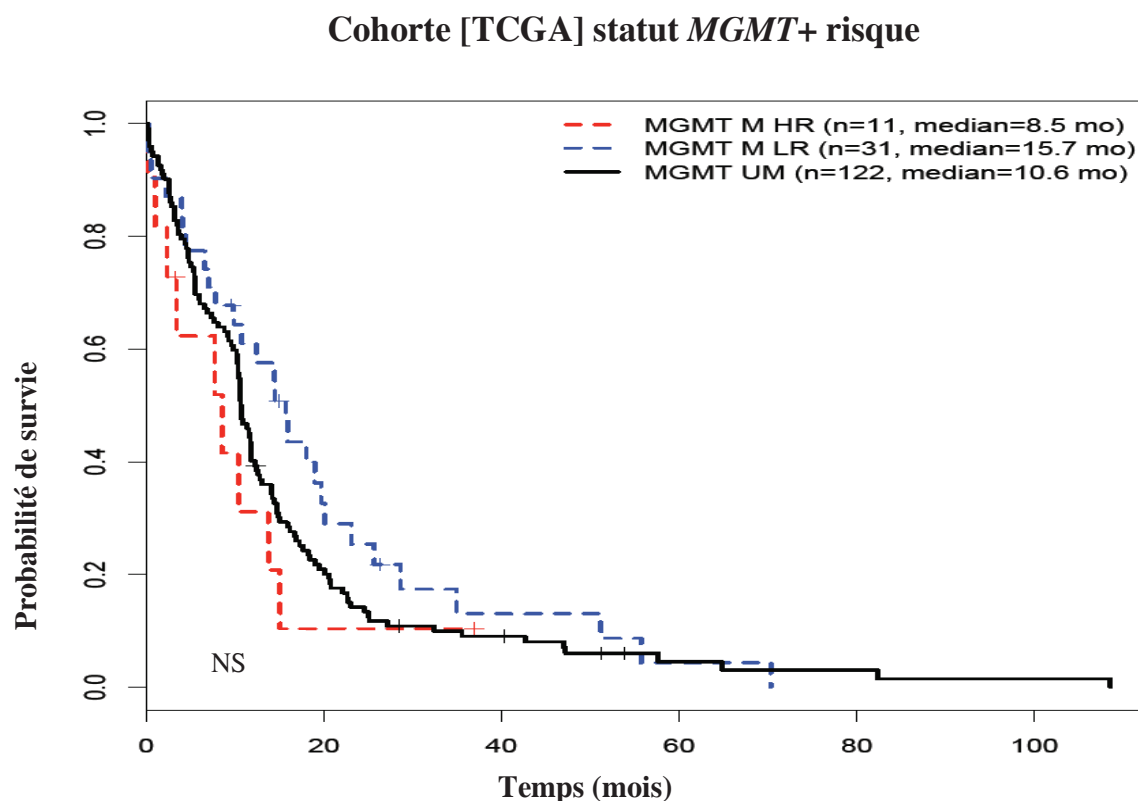


Figure 21 : courbe de survie en fonction du risque et du statut *MGMT* sur le jeu publié par Verhaak (n=164 GBM).

La courbe de survie selon Kaplan-Meier des patients à haut risque avec un statut *MGMT* méthylé (n=11, médiane de survie à 8,5 mois) est représentée en rouge pointillé, celle des patients à bas risque avec un statut *MGMT* méthylé en bleu pointillé (n=31, médiane de survie à 15,7 mois) et celle des patients ayant un statut *MGMT* non méthylé en noir en trait plein (n=122, médiane de survie à 10,6 mois).

Cependant, dans le groupe de plus grand effectif de cette cohorte de TCGA (promoteur de *MGMT* non méthylé, n=122), le risque à 6 gènes sépare 2 sous groupes de pronostic différent (Cf. Figure 22).

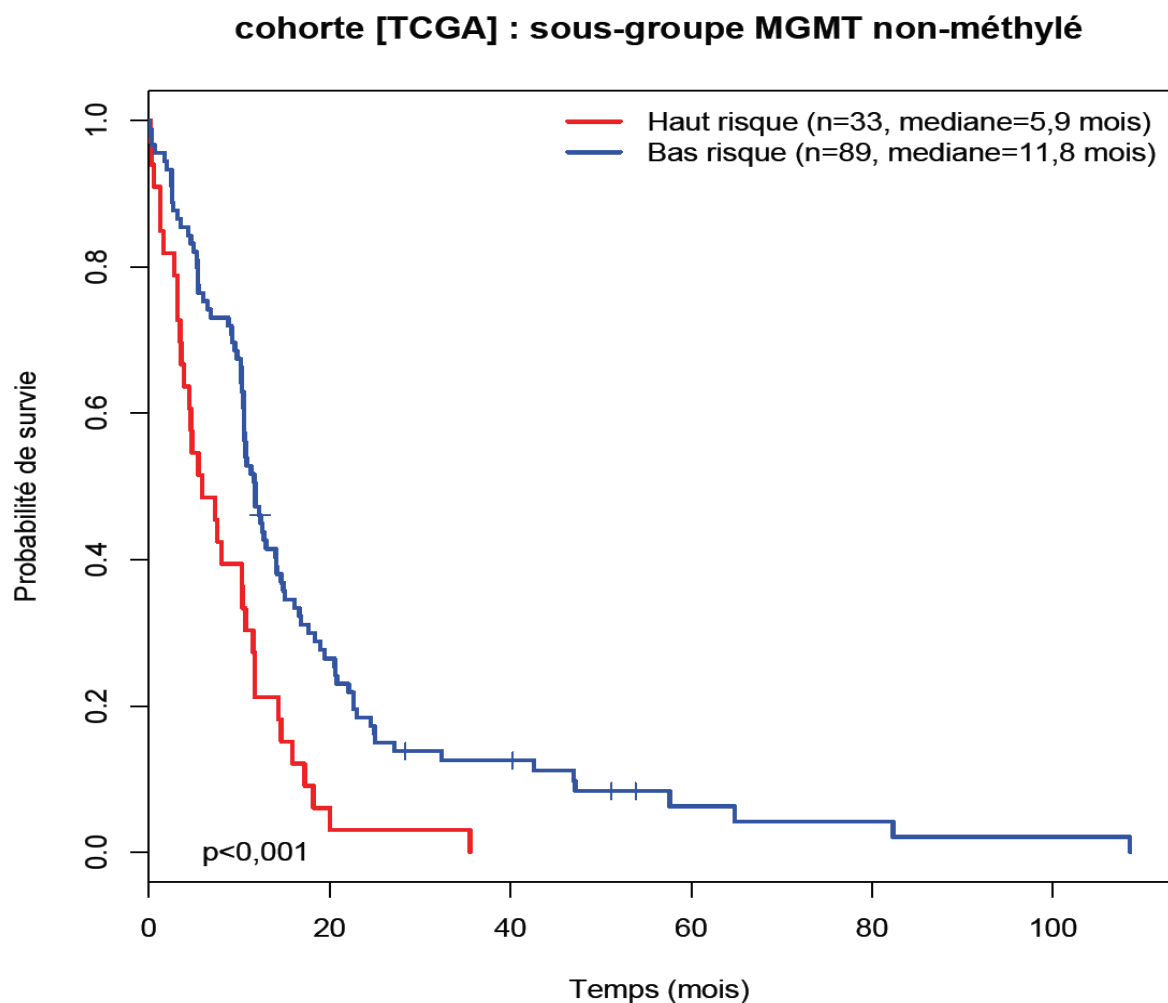


Figure 22 : courbe de survie en fonction du risque si promoteur *MGMT* non méthylé sur le jeu publié par Verhaak (n=122 GBM).

La courbe de survie selon Kaplan-Meier des patients à haut risque avec un statut *MGMT* non méthylé (n=33, médiane de survie à 5,9 mois) est représentée en rouge en trait plein, celle des patients à bas risque avec un statut *MGMT* non méthylé en bleu en trait plein (n=89, médiane de survie à 11,8 mois).

Il s'agit peut-être d'un défaut de puissance dans le groupe de patients ayant un promoteur de *MGMT* méthylé publié par Verhaak, qui ne permet pas d'atteindre une significativité suffisante même si l'on observe une tendance concordante.

2.3.7. Modèle de risque à 6 gènes et sous-types de GBM

Récemment, 3 sous-types transcriptomiques de GBM ont été décrits par Phillips et *al.* : proneural, proliférant et mésenchymateux. Verhaak et *al.* ont également classé les GBM selon 4 sous-types transcriptomiques : proneural, classique, mésenchymateux et neural (147;164).

Les sous-groupes de GBM dits proneuraux et mésenchymateux semblent les plus robustes, ils sont retrouvés selon les 2 classifications. Comme les GBM proneuraux sont les seuls dans ces 2 publications à avoir un impact sur la survie, les GBM ont été analysés en fonction de leur appartenance ou non au sous-groupe proneural (147;165).

Nous avons donc analysé l'intérêt du risque à 6 gènes en fonction des sous-groupes de GBM dans les 2 cohortes publiées par Verhaak et *al.* et Lee et *al.* et dans uniquement notre cohorte locale de 41 GBM et TGNM (l'attribution des sous-groupes étant impossible pour la cohorte de RT-Q PCR). Le risque à 6 gènes permet de séparer le sous-groupe de GBM proneuraux dans la cohorte GSE13041 en deux bras de pronostic différent. La médiane de survie des 20 patients de bas risque est de 28,7 mois versus 11,9 mois chez les 21 patients de haut risque ($p < 0,001$) (Cf. Figure 23). La courbe de survie des patients ayant un GBM proneural à haut risque se rapproche de celle des GBM non proneuraux (médiane de 12,9 mois).

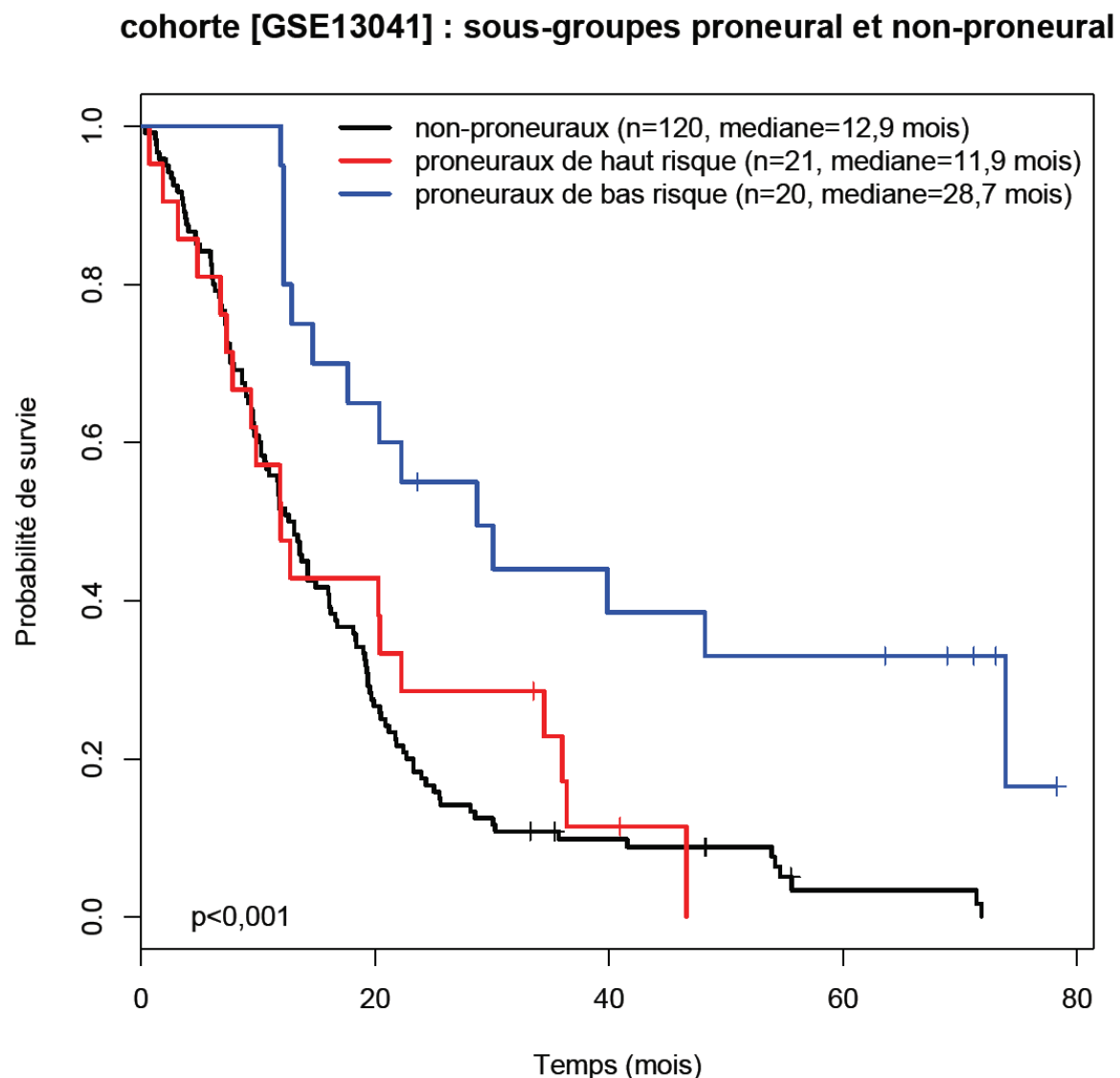


Figure 23 : courbe de survie en fonction du risque si GBM proneural versus non proneural sur le jeu publié par Lee (n=161 GBM).

La courbe de survie selon Kaplan-Meier des patients à haut risque proneuraux (n=21, médiane de survie à 11,9 mois) est représentée en rouge, celle des patients à bas risque en bleu proneuraux (n=20, médiane de survie à 28,7 mois) et celle des patients non proneuraux en noir (n=120, médiane de survie à 12,9 mois).

Dans la cohorte du TCGA, le risque à 6 gènes classe 35 patients ayant un GBM proneural à bas risque avec une survie médiane statistiquement plus longue de 11,3 mois versus 3,4 mois chez les 13 patients ayant un GBM proneural à haut risque (Cf. Figure 24).

cohorte [TCGA] sous-groupes proneural et non-proneural

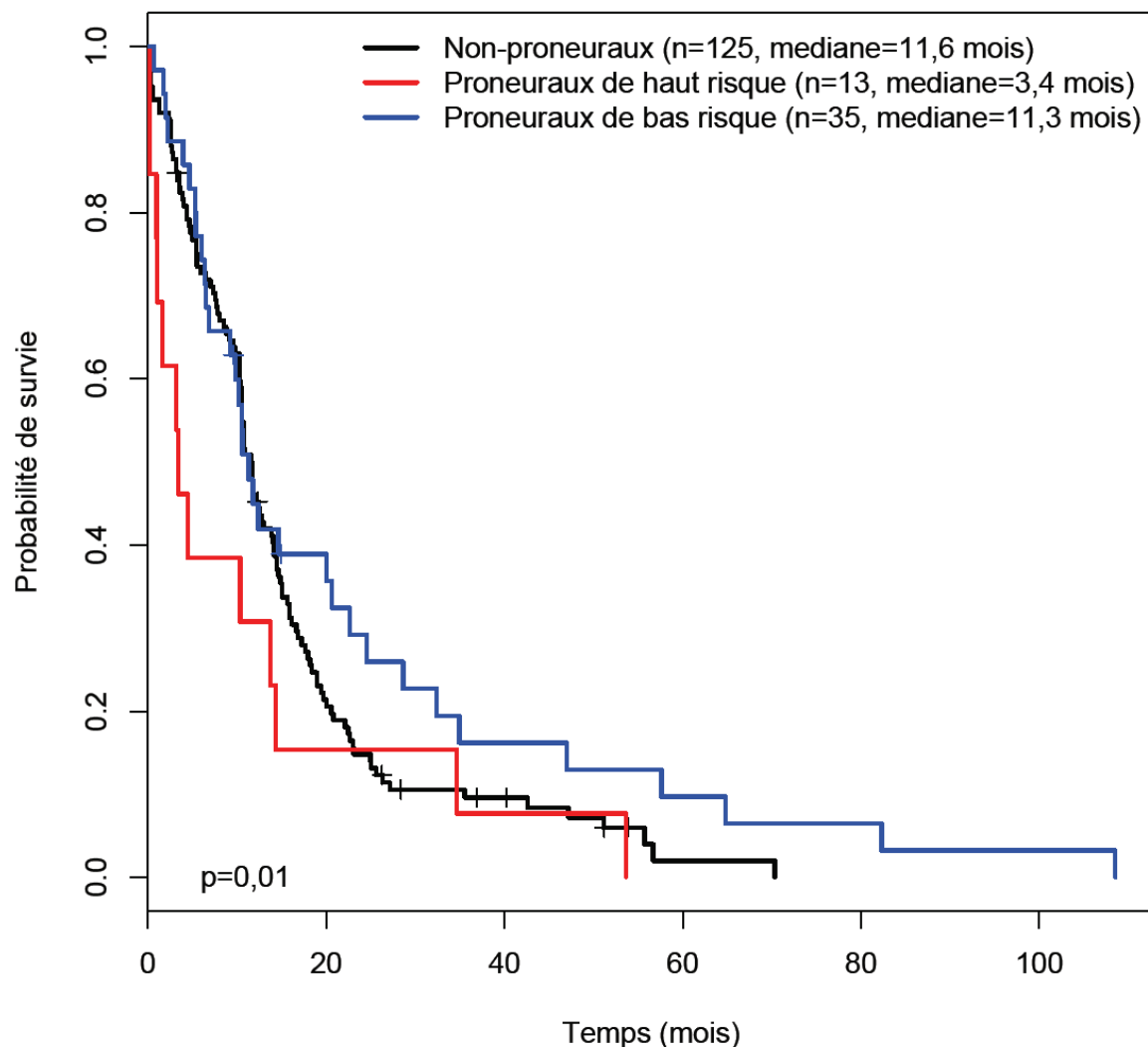


Figure 24 : courbe de survie en fonction du risque si GBM proneural versus non proneural sur le jeu publié par Verhaak (n=173 GBM).

La courbe de survie selon Kaplan-Meier des patients à haut risque proneuraux (n=13, médiane de survie à 3,4 mois) est représentée en rouge, celle des patients à bas risque en bleu proneuraux (n=35, médiane de survie à 11,3 mois) et celle des patients non proneuraux en noir (n=125, médiane de survie à 11,6 mois).

Dans notre cohorte locale, 12 patients sont classés dans le sous-groupe de GBM proneuraux.

Dix patients ayant un GBM proneural ont un bas risque selon le modèle mathématique avec une survie médiane de 24,8 mois et deux patients seulement sont considérés à un haut risque avec une survie médiane de 4,7 mois.

Bien que les effectifs soient faibles dans chaque sous-groupe, la différence de survie est statistiquement significative. Dans les autres sous-types, rassemblés ici sous la dénomination de non proneuraux, le risque à 6 gènes ne permet pas de les différencier en 2 sous-groupes pronostiques statistiquement significatifs (Cf. Figure 25). La courbe de survie des patients traités pour un GBM non proneural est entre celle des GBM proneuraux à haut risque et à bas risque.

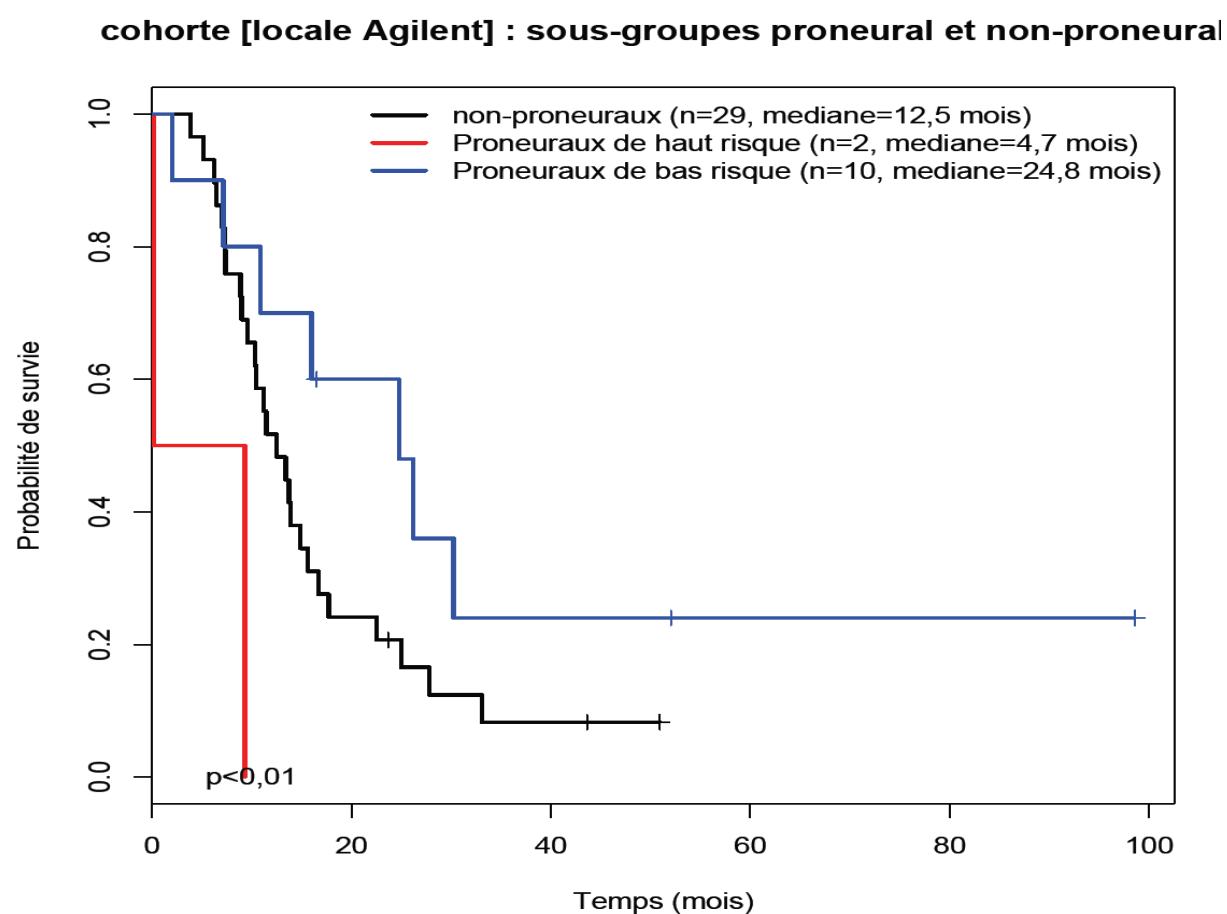


Figure 25 : courbe de survie en fonction du risque si GBM proneural versus non proneural sur la cohorte locale Agilent (n=41 GBM).

La courbe de survie selon Kaplan-Meier des patients à haut risque proneuraux (n=2, médiane de survie à 4,7 mois) est représentée en rouge, celle des patients à bas risque en bleu proneuraux (n=10, médiane de survie à 24,8 mois) et celle des patients non proneuraux en noir (n=29, médiane de survie à 12,5 mois).

2.4. Discussion

2.4.1. Expression des gènes immuns dans les GBM

Nous avons mis en évidence un profil d'expression des gènes immuns différent entre le cerveau non tumoral dit normal et le GBM. Plus d'une centaine de gènes sont ainsi exprimés différemment entre le cerveau normal et le GBM. Cela souligne une probable implication du système immunitaire dans le glioblastome avec des gènes plus ou moins activés dans cette pathologie. Ainsi parmi les gènes d'expression différentielle dans le GBM, nous retrouvons la plupart des gènes immunitaires qui ont été déjà rapportés fréquemment dans la littérature, tels que les gènes des cytokines, des chimiokines, leurs récepteurs, les clusters de différenciation et les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité.

Nous retrouvons également les gènes, dont l'action immunitaire est moins ou mal connue et 4 des 6 gènes du modèle de risque (*FGF2*, *CD22*, *MNX1*, *RPS19*). Ces gènes pourraient constituer des cibles thérapeutiques potentielles pour une immunothérapie, du fait de leur expression différente entre le cerveau normal et le GBM. Cependant nous savons que le GBM est une tumeur hétérogène, nous avons démontré que l'expression des gènes varie d'une tumeur à l'autre. Or pour augmenter l'efficacité des stratégies d'immunothérapie, il faudrait cibler les gènes immunitaires communs d'expression différentielle homogène dans le GBM. Malheureusement, la plupart des gènes présentent une expression différentielle hétérogène inter-tumorale. Une autre possibilité serait de classer les GBM en sous-groupes en fonction de l'expression des gènes et de proposer une thérapie plus ciblée en fonction du profil d'expression.

Ces gènes immunitaires différemment exprimés entre le cerveau non tumoral et les échantillons de GBM et au sein des GBM sont potentiellement exprimés dans différentes cellules immunitaires (lymphocytes B, T, NK...) et lors des réponses immunitaires innée et/ou acquise.

Nous avons voulu préciser l'implication éventuelle du système immunitaire dans le GBM en procédant à une analyse de réseaux de co-expression des gènes immunitaires. Après annotation fonctionnelle grâce au logiciel DAVID, un enrichissement des gènes retrouve par ordre de p-values significatives les fonctions suivantes : activation des leucocytes, activation cellulaire, fonction membranaire, fonction transmembranaire et activation lymphocytaire ($p < 0,001$).

De récentes études transcriptomiques ont rapporté des signatures immunitaires dans les profils d'expression des gènes dans les gliomes (164;166-168;201-203;209;210;212;213;216;217;219-221;225) et dans le GBM (147;153;165;190;204-208;211;214;215;222-224;226-228). Dans notre étude, nous retrouvons 6 modules de co-expression (cellules NK-immunité innée, cytokines-CMH, signalisation cellulaire-lectines, activation cellulaire-apoptose, cellules myéloïdes et régulation de la réponse immunitaire).

La plupart des signatures établies sont associées aux cellules myéloïdes ou macrophages (190;201-203;206;208;209;211), ce qui est en accord avec l'infiltration déjà décrite de macrophage/microglie dans les GBM (364;484;492). Nous avons également trouvé une signature myéloïde et monocyte/macrophage dans 2 modules de co-expression comportant par exemple les gènes *CD11b*, *CD14*, *CD163*, *CMH de classe I* et *TLR*. Une signature NK mise en évidence dans notre étude a été également rapportée dans la littérature (201;210;211;217).

Deux signatures pronostiques cellules NK-réponse innée et cytokines-chimiokines ont été mises en évidence par l'enrichissement en gènes associés à la survie de ces 2 modules. Les cytokines et chimiokines du module de co-expression sont soit impliquées dans le recrutement des cellules T, monocytes/macrophages et neutrophiles (gènes *CX3CR1/CX3CL1*, *CXCL9* et *CXCR2*), soit dans la régulation des monocytes/macrophages, éosinophiles, cellules T et NK (gènes *MIF*, *IL5*, *IL12A* and *IL16*).

Ainsi, les 2 modules de co-expression enrichis significativement en gènes associés à la survie (cellules NK, cytokines et chimiokines) dans notre étude, semblent refléter le recrutement de diverses cellules immunes telles que les cellules NK, T, monocytes/macrophages et neutrophiles et témoignent également de l'implication potentielle de la réponse innée dans la survie de patients traités pour un GBM.

2.4.2. Expression des gènes immuns associés à la survie globale des patients

Les signatures immunes publiées associées à la survie des patients sont controversées en terme de cellules impliquées (myéloïdes, macrophages, cellules T, NK) et en terme de valeur pronostique (survie péjorative ou plus longue). Murat et *al.* ont rapporté une survie plus longue en cas de signature de réponse innée ou macrophagique (cluster G24, 134 sondes dont *CD11b* et *CD163*) (208), contrairement aux autres données publiées. Gravendeel et *al.* ont ainsi décrit une signature de réponse immunitaire associée à une survie courte dans les gliomes (Cluster 23, catégorie fonction M) (166), Irliev et *al.* ont décrit une signature T (CD4 et CD8) et myéloïde (CMH type II, TLR1 et 2) de 499 gènes associés à une évolution également plus péjorative (module M7) (202) et Godard et *al.* ont rapporté une signature NK (cluster de gènes G12 incluant récepteur Fc gamma et DAP-12) plus exprimée dans les GBM de *novo* de mauvais pronostic par rapport aux GBM secondaires et aux astrocytomes de bas grades (201). Ducray et *al.* ont rapporté une signature plus immune (cluster G24) chez les répondeurs à la radiothérapie (204). Les 2 études les plus récentes sont également controversées avec un pronostic favorable d'une signature immune T, microglie-macrophage et réponse innée dans l'article de Donson et *al.* (190) alors que la signature immune macrophage, monocyte et granulocyte décrite par Engler et *al.* est associée à un pronostic péjoratif (211).

La signature immune obtenue par notre analyse de co-expression network a également une valeur pronostique. En effet, 5 des 6 modules retrouvés sont enrichis en gènes ayant un impact sur la survie globale. Malheureusement, nous ne pouvons pas savoir par cette méthode si l'impact de l'expression (sur ou sous expression dans le GBM) de ces gènes sur la survie est péjoratif ou non. Bien que ces données soient d'interprétations difficiles, elles soulignent cependant qu'une signature immune pourrait avoir un impact pronostique. Nous avons voulu approfondir ces résultats préliminaires par d'autres méthodes mathématiques et déterminer parmi les gènes immuns associés à la survie, lesquels constituent des variables indépendantes qui contribuent le mieux à expliquer la survie au sein de nos cohortes de GBM.

Dans notre étude, nous avons mis en évidence par 3 différentes méthodes statistiques 108 gènes immuns associés directement avec la survie de patients traités pour un GBM. Ces 108 gènes associés à la survie sont connus comme impliqués dans la biologie des cellules B (gènes des immunoglobulines, *BLNK*, *CD19*, *CD20*, *CD22*...), des cellules T (*CD1E*, *PTCRA*, *CD247*...), NK (*KIR2DL1*, *KIR2DL4*, *KIR3DL3*...), des cellules myéloïdes incluant les monocytes/macrophages (*ADAMDEC1*, *CD89/FCAR*, *CD64/FCGR1B*, *FCGR1C*...) et les neutrophiles (*CD89*, *NCF1B*...). Ces gènes peuvent également correspondre à des cytokines ou chimiokines (*CCL15*, *CCL17*, *IL1B*, *IL5*...) ou correspondre à des gènes impliqués dans la modulation de la réponse immune (*APRIL*, *ARG1*, *CD70*, *B7-H4*, *ICOSLG*, *NOS2A*, *TGFB1*, *TWEAK*...). En effet, le GBM développe des mécanismes intrinsèques pour inhiber la réponse immune anti-tumorale (484;485) et facilite l'infiltration de cellules suppressives telles que les LTreg (397) et les monocytes suppresseurs (360).

Marko et *al.* distinguent par une étude préliminaire génomique les gènes immuns en fonction de leur impact sur la survie. Deux groupes de patients de survie différente sont définis : GBM survivant plus de 2 ans (n=7) versus moins de 9 mois (n=13) (207). Dans cette étude, 2 gènes immuns (*IL17* et *SERPING1*) sur les 6 associés significativement à la survie (*CD34*, *IGHG1*, *IL13RA1*, *IL22*) sont corrélés positivement. Dans notre analyse de profils immuns au sein des GBM, les gènes *CD34*, *IGHG1*, *IL13RA1*, et les récepteurs A, B, C de l'*IL17* sont également différentiellement exprimés. Mais ils ne sont pas retrouvés significativement associés à la survie des patients. L'impact pronostique rapporté dans la littérature de ces 6 gènes immuns est peut-être lié à la sélection de l'étude publiée par Marko et *al.* (longs versus courts survivants).

Finalement, nous avons établi un modèle de risque de survie basée sur l'expression pondérée de 6 gènes en suivant la méthode décrite par Marie de Tayrac et *al.* de notre laboratoire (169). Ce modèle permet de discriminer les patients traités pour un GBM par le traitement standard de chimio-radiothérapie concomitante puis adjuvante en 2 groupes de survie statistiquement différent. Ces 6 gènes du risque *ACVR2A*, *ARG1*, *CD22*, *FGF2*, *MNX1* et *RPS19* sont répartis dans les 5 modules de co-expression enrichis en gènes ayant un impact sur la survie et peuvent être considérés comme leurs représentants. *MNX1* et *RPS19* font partie des 27 gènes impactant par eux-même la survie dans l'analyse de co-expression. *ACVR2A*, *CD22* et *MNX1* sont retrouvés significatifs dans les 3 méthodes statistiques utilisées précédemment.

Ces 6 gènes ne sont pas tous connus pour être des marqueurs spécifiques des cellules immunes ou des sous-populations de cellules immunes. Bien qu'ils soient connus dans certains cancers, ils n'ont pas ou peu été décrits dans le GBM.

ACVR2A est le récepteur pour l'activine A, plus particulièrement de type 2A, il appartient à la superfamille de TGF β . Ce récepteur est une protéine transmembranaire composé d'un domaine extracellulaire, riche en cystéine, un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique sérine/thréonine. Le ligand se fixe sur le domaine extracellulaire du récepteur de type II, puis se forme un complexe hétérodimérique avec un récepteur de type I, qui transmet le signal après phosphorylation par le récepteur de type II. *In vitro*, l'activine A peut induire la différenciation neuronale (493) et elle semble essentielle pour la neurogenèse suite à une dégénération neuronale (494). Dans les modèles murins, l'activine A stimule la croissance névritique et réduit le nombre de neurones altérés (495;496). En synergie avec l'action de FGF, ACVR2A transmet le signal de croissance de l'activine via la phosphorylation de SMAD2, notamment dans la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques (497). De plus, l'activine A et le FGF semblent participer à la maintenance du phénotype des cellules souches embryonnaires humaines (498). La mutation de ce gène *ACVR2A* est fréquente dans le cancer du colon avec instabilité des microsatellites (499). Une étude montre également que l'infiltration de cellules immunes T CD3+ est associée à la mutation de ce gène dans 92% des cas et à un meilleur pronostic que celle sans infiltration (500). *ACVR2A* est un gène retrouvé dans notre étude significativement associé à la survie selon les 3 méthodes statistiques et son ligand codé par le gène *INHBA* est également retrouvé significativement associé à la survie selon la méthode Cox pas à pas.

ARG1, l'arginase 1 est une enzyme cytosolique qui hydrolyse l'arginine en urée et ornithine, les précurseurs de la synthèse des polyamines, proline et glutamate (501). L'arginine semble essentielle dans le cerveau pour le protéger des dommages ischémiques induits par l'oxyde nitrique (502;503). ARG1 est impliquée dans les mécanismes d'immunosuppression en diminuant l'activation des cellules T (504). IL4, IL10, IL13, TGF β , PGE2 stimulent la

production d'arginase (505). Chez les patients ayant un GBM, il a été montré qu'une population de neutrophiles dégranulés est associée à une augmentation du taux d'ARG1 plasmatique et une expression plus faible de cellules T CD3 chaîne zeta (506). Une supplémentation en arginine contrecarre ces effets d'immunosuppression (506). Les MDSC inhibent la réponse T allogénique *in vitro* via la déplétion en L-arginine par la sécrétion d'ARG1 (507-511). Chez des patients ayant un cancer bronchique non à petite cellule non traité, une étude a montré que les cellules CD11b+/CD14-/CD15+/CD33+ correspondant aux MDSC expriment l'oxyde nitrique synthase inductible (inducible nitric oxide synthase en anglais iNOS) et l'ARG1 (512). Une autre étude a montré que l'apport exogène d'IL13 dans la culture augmente l'expression d'ARG1, qui est nécessaire pour l'activité suppressive du sous-groupe de MDSC, appelé MDSC-IL13 (507).

CD 22, récepteur de cellules B (ou sialic acid-binding Ig-like lectin en anglais SIGLEC 2), est un membre de la superfamille des immunoglobulines et considéré comme une molécule d'adhésion et de signalisation (513;514). Il est normalement exprimé par les cellules B activées (514). Le CD22 est un médiateur des interactions entre les lymphocytes B, il jouerait également un rôle dans la localisation des LB dans les tissus lymphoïdes et dans la régulation positive via les tyrosines kinases de la famille Src. Il agit comme un récepteur inhibiteur en recrutant des phosphatases via leur domaine SH2 et bloquerait la transduction du signal grâce à la déphosphorylation des molécules de la transduction du signal (515). Dans notre étude, l'expression du CD22 est de mauvais pronostic, or les lymphocytes B infiltrent rarement les GBM comme nous le verrons dans la prochaine partie. Le CD22 agirait donc via d'autres cellules. Une étude a rapporté par exemple que les neurones peuvent le sécréter pour inhiber via le CD45 l'activation de la microglie (516). Si l'action macrophagique est inhibée par le CD22, la prolifération du GBM peut être activée.

FGF 2, facteur de croissance fibroblastique basique ou de type 2, appartient à la famille des facteurs de croissance. Le gène *FGF* joue un rôle dans de nombreux processus biologiques, la protéine FGF2 stimule la croissance du GBM notamment (517). Le taux plasmatique de FGF semble plus élevé chez les patients ayant un GBM par rapport aux témoins (518). Le récepteur FGFR1 est exprimé dans le GBM contrairement au tissu normal, alors que FGFR2 n'est pas retrouvé dans le GBM (519). Par définition FGF est un facteur de croissance, il est souvent associé à un pronostic péjoratif car son accumulation nucléaire favorise la prolifération (520). Il existe 4 isoformes de la protéine FGF2 aux propriétés biologiques différentes (521) : comme la sensibilité à l'irradiation *in vitro* des formes de bas poids moléculaires (522). Cependant l'isoforme de FGF2 de haut poids moléculaire semble pouvoir également inhiber la prolifération gliale *in vivo* via l'inhibition de 4E-BP1 (523), ce qui pourrait expliquer que l'expression de FGF2 soit associée à un meilleur pronostic dans notre étude.

Le gène *MNX1* code pour une protéine nucléaire, qui contient un domaine homéobox comme le souligne son autre nom (homéobox du motoneurone et du pancréas). Ce gène est surtout connu comme gène responsable du syndrome de Currarino, en effet la présence d'une mutation de ce gène entraîne des malformations congénitales (malformation hémisacrée, anorectale associée à une masse présacrée), transmises de manière autosomique dominante (524;525). Il a été initialement décrit comme un facteur de transcription des cellules CD34+ et cellules B (526). Il est impliqué dans le développement de leucémies (527) et de tumeurs solides comme le cancer du colon (528) et le carcinome hépatocellulaire (529). Son expression intervient également dans la neurogenèse (530) notamment dans la différenciation en motoneurone, son action dans le GBM est encore mal connue.

Le gène *RPS19* code pour la sous-unité 40S de la protéine ribosomale cytosolique 19S, connue pour être responsable de l'anémie de Diamond-Blackfan (531;532). Cette maladie correspond à une érythroblastopénie constitutionnelle caractérisée par l'absence ou la diminution du nombre de précurseurs érythroïdes. Ce gène aurait ainsi une fonction extra-ribosomale notamment dans la différenciation et la prolifération érythropoïétique (533). *RPS19* serait également impliqué dans l'apoptose via la voie de signalisation p53/BAX (534). Le dimère *RPS19* a une action chimiotactique sur les monocytes et neutrophiles dans l'arthrite rhumatoïde (331;535;536). La protéine *RPS19* est en effet sécrétée par les cellules apoptotiques, or une dose faible inhiberait l'interaction du MIF et de CD74, et elle compromet l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales via CXCR2 en limitant la disponibilité de MIF pour son récepteur favorisant le chimiotactisme (332;537). Un niveau élevé d'expression de ce gène *RPS19* dans les selles a été rapporté comme de bon pronostic dans les carcinomes coliques (538). De plus, *FGF2* interagit avec *RPS19* pour conduire les cellules vers la signalisation de différenciation ou de prolifération (539-541). Ces 2 gènes, qui interagissent ensemble, sont les 2 gènes de bon pronostic de notre modèle. L'action de *RPS19* est peu connue dans le GBM, elle est peut-être liée à la fonction chimiotactique sur les monocytes, à l'inhibition de l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales, à son action apoptotique et/ou à sa fonction de différenciation.

Pour confirmer la robustesse de notre modèle à 6 gènes, nous avons validé ces résultats sur d'autres études de biopuces Affymetrix publiées (147;165), sur une cohorte locale de biopuces Agilent et enfin sur les données de RT-PCR quantitative d'une cohorte locale homogène de patients traités de manière standard pour un GBM selon le protocole publié par Stupp (74). Cette dernière technique a l'avantage d'être utilisable en routine dans la plupart des laboratoires tout en restant abordable par rapport aux techniques de microarrays.

Le risque à 6 gènes sépare les patients en 2 groupes pronostiques et il permet également de discriminer au sein des patients ayant un meilleur pronostic, défini par la méthylation du promoteur de *MGMT*, deux groupes ayant des survies statistiquement différentes. Actuellement, on distingue deux sous-groupes dans le GBM en fonction du statut du gène de la *MGMT*. Or bien que certains patients ont une tumeur dont le promoteur de *MGMT* est méthylé, l'évolution est parfois péjorative à court terme. Ce risque à 6 gènes devrait être validé en prospectif car il pourrait aider à découvrir un sous-groupe de patients ayant un pronostic plus péjoratif malgré la méthylation du promoteur de *MGMT*. Ce risque à 6 gènes immuns pourrait permettre de mieux stratifier dans l'avenir les patients pour mieux adapter les prises en charge dans le cadre ou non d'essais thérapeutiques.

Les classifications des GBM en sous-types proneuraux, mésenchymateux, neuraux, classiques et proliférants selon Verhaak et Phillips (147;164) sont actuellement systématiquement étudiées pour mieux caractériser les données biologiques des GBM. Les GBM de sous-types proneuraux semblent avoir une survie plus longue d'après ces études quel que soit le traitement (147;204). Mais Holland et *al.* soulignent le caractère hétérogène de ce groupe dans leurs dernières présentations orales et publications (542).

Le risque à 6 gènes permet de différencier deux sous-groupes de pronostic différent chez les patients ayant un GBM proneural. Cette différence n'est pas significative dans les autres sous-types de GBM. Nous pourrions supposer du fait d'une survie plus longue, que la réponse immune antitumorale a plus de temps pour être initiée et ralentir par ce fait la progression tumorale chez ces patients ayant un profil immun particulier mis en valeur par ce risque à 6 gènes (proneuraux à bas risque). D'autres études sont nécessaires pour valider ces hypothèses. Par ailleurs, l'impact du risque à 6 gènes dans le sous-type proneural pourrait nous inciter à leur proposer des essais d'immunothérapie. Cependant, Prins et *al.* retrouvent une survie plus

longue après une vaccination à base de cellules dendritiques dans un sous-groupe de GBM mésenchymateux, qui ont une infiltration lymphocytaire CD3+ CD8+, par rapport à une cohorte historique de contrôle de même expression génique (403). La vaccination a peut-être permis de rendre plus sensible cette sous-population résistante au traitement conventionnel (543). Aucune différence de survie a été mise en évidence dans le sous-groupe de GBM proneural après la vaccination par rapport à une cohorte historique contrairement à ce que nous pourrions penser. La réponse immune antitumorale a peut-être déjà eu lieu permettant d'obtenir spontanément une survie plus longue sans réponse supplémentaire de la stimulation de l'immunité par une vaccination sur la survie des patients pris en charge pour un GBM de sous-type proneural. Ces hypothèses doivent être étudiées puis validées en prospectif.

ARTICLE N°6 (544) :

Immune genes are associated with human glioblastoma pathology and patient survival.

Vauléon E, Avril T, Hamlat A, Etcheverry A, Chiforeanu DC, Menei P, Mosser J, Quillien V, Aubry M.

BMC Med Genomics. 2012 Sep 14;5:41.

3. Etude des cellules immunes infiltrant les glioblastomes

3.1. Objectifs

Nous avons montré dans la partie précédente qu'au niveau génomique, une signature immunologique est associée au GBM et à la survie des patients. Nous avons complété ce travail par l'étude des cellules immunes infiltrant les GBM.

De nombreux travaux publiés sont basés sur des études en IHC et décrivent des petites cohortes de patients. Un des inconvénients de l'IHC est l'impossibilité de combiner différents marqueurs pour caractériser les cellules. Nous avons choisi d'aborder cette question en utilisant une analyse par cytométrie en flux qui nous permet d'utiliser plusieurs marqueurs en même temps mais aussi de quantifier de façon précise des sous-populations cellulaires.

Pour cela, nous avons travaillé sur des prélèvements tumoraux qui ont été dissociés puis congelés en présence de diméthylsulfoxyde (DMSO) pour préserver les cellules. Dans un premier temps, nous avons validé le fait que la congélation n'affecte pas la proportion initiale de cellules infiltrant les GBM.

Nous avons ensuite étudié la proportion des cellules immunes viables CD45+ en utilisant cette banque de prélèvements tumoraux issus de GBM (n=73), de gliomes de grade III (n=12), gliomes de grade II (n=8) et de cerveaux issus de chirurgie d'épilepsie (n=2). La caractérisation des cellules infiltrant les tumeurs a été réalisée en utilisant des marqueurs exprimés par les différents contingents cellulaires immuns que sont les cellules monocytaires, lymphoïdes et granulocytaires. Nous avons ensuite confirmé que cette infiltration est présente sur le site tumoral mais pas dans le parenchyme sain ou à la marge de la tumeur; et qu'elle n'est pas influencée par la prise de corticoïdes.

Enfin nous avons étudié l'association de cette infiltration avec la survie des patients.

3.2. Matériel et méthodes

3.2.1. Echantillons tumoraux

Les prélèvements sont issus de patients atteints de tumeurs cérébrales et opérés dans le service de Neurochirurgie à l'hôpital Pontchaillou de Rennes, en accord avec le comité local d'Ethique. Les échantillons tumoraux sont prélevés par le neurochirurgien au bloc opératoire puis directement collectés dans un tube de 50 ml contenant du milieu minimum essentiel d'Eagle modifié par Dulbecco (DMEM) (Lonza®).

Les informations cliniques des patients ont également été collectées, notamment le sexe, la date de naissance, la prise de corticoïdes et la survie globale.

Les prélèvements sont disséqués afin d'enlever les vaisseaux sanguins puis coupés en morceaux de 2 à 3 mm³. Les fragments sont déposés dans un tube de type C (Miltenyi Biotec®) à raison de 1 à 3 g pour 10 ml de milieu DMEN. Les tissus tumoraux sont ensuite dissociés à l'aide de l'appareil GentleMacs (Miltenyi Biotec®) en utilisant le programme «m_impTumor_01» (maximum 10 ml de tissu dans le tube C GentleMacs®). Les prélèvements dissociés sont passés sur un tamis de 100 µm (BD Falcon®) et la suspension cellulaire est centrifugée 10 minutes (min) à 400g à température ambiante. Le culot cellulaire est remis en suspension et l'équivalent de 0,03 g de tissu est soit analysé directement, soit congelé à -150°C avec de l'albumine sérique humaine (human serum albumin en anglais HSA) 4% (LFB Biomédicaments®) contenant 10% DMSO.

3.2.2. Phénotypage des cellules infiltrant les tumeurs

3.2.2.1. Préparation des échantillons

L'équivalent de 1,5 mg de tissu est collecté par tube de cytométrie de flux (fluorescence activated cell sorter en anglais FACS) (BD Falcon®) et additionné de 2 ml de tampon phosphate salin (phosphate buffered saline en anglais PBS), contenant 2% de sérum de veau foetal (SVF) (Lonza®). Pour les prélèvements congelés, les cellules sont tout d'abord décongelées dans 25 ml de PBS contenant 20% de SVF. Après centrifugation de 10 min à 400g, le culot cellulaire est remis en suspension avec du PBS 2% SVF. Les cellules sont centrifugées 10 min à 400g. Le culot cellulaire est remis en suspension dans 50 µl de PBS 2% SVF puis incubé avec 2 µg d'Ig humaines (Sigma-Aldrich®) pendant 5 min à température ambiante. Les cellules sont ensuite incubées avec les anticorps ciblant les marqueurs d'intérêt et directement marqués avec des fluorochromes (Cf. Tableau 9) pendant 30 min à 4°C. Les cellules sont lavées deux fois avec 2 ml de PBS contenant 2% de SVF puis le culot cellulaire est remis en suspension dans 350 µl de PBS/SVF. Dix µl de la 7-aminoactinomycine D (7AAD, BD Biosciences®), colorant qui a une forte affinité pour l'ADN et permettant ainsi de repérer les cellules mortes, sont ajoutés 10 min avant l'analyse par cytométrie en flux. Les anticorps décrits dans le tableau 9 nous ont servi pour l'analyse des sous-populations microgliale et macrophagique, granulocytaire et lymphocytaire.

Cluster of differentiation (CD)	Description	Cellules exprimant ce marqueur	Anticorps (Clone, isotype, fluorescence)*
CD3	Chaîne du complexe TCR	Lymphocytes T	SK7, mIgG1κ, APC
CD4	Protéine accessoire du TCR	Lymphocytes T, Monocytes/Macrophages	SK3, mIgG1κ, PECy7
CD8	Protéine accessoire du TCR	Lymphocytes T, NK	RPA-T8, mIgG1κ, FITC
CD11b	Intégrine αM	Monocytes/Macrophages, Granulocytes, lymphocytes NK	ICRF44, mIgG1κ, PECy7
CD11c	Intégrine αX	Monocytes/Macrophages, Granulocytes, lymphocytes NK	B-ly6, mIgG1κ, PE
CD14	Récepteur du LPS	Monocytes/Macrophages	MφP9, mIgG2bκ, APC
CD15	Antigène SSEA1	Granulocytes	HI98, mIgMκ, APC
CD16	Récepteur FcγRIIIA	Neutrophiles Monocytes/Macrophages	3G8, mIgG1κ, FITC
CD19	Chaîne du complexe BCR	Lymphocytes B	HIB19, 10.1
CD25	Récepteur de l'IL2	Lymphocytes T	2A3, mIgG1κ, PE
CD33	Molécule Siglec-3	Monocytes, Granulocytes	P67.6, mIgG1κ, PE
CD45	Chaîne de signalisation	Tous les leucocytes	2D1, mIgG1κ, APCCy7
CD64	Récepteur FcγRI	Monocytes/Macrophages	10.1, mIgG1κ, FITC
CD66b	Molécule CEACAM8	Granulocytes	G10F5, mIgMκ, FITC
CD105	Endogline	Monocytes/Macrophages, Cellules endothéliales	1G2, mIgG3, PE
CD127	Récepteur de l'IL7	Lymphocytes T	hIL-7R-M21, mIgG1κ, A647
CD163	Récepteur haptoglobine-hémoglobine-	Monocytes/Macrophages	GHI/61, mIgG1κ, PE
HLA-DR	Molécule du CMH de classe II	Monocytes/Macrophages Lymphocytes B	L243 (G46-6), mIgG1κ, PE
NKp46	Molécule NCR1	Lymphocytes NK	9E2/NKp46, mIgG1κ, PE

Tableau 9: Liste des marqueurs utilisés pour le phénotypage des leucocytes infiltrant les tumeurs.

Abréviations utilisées : m : mouse ; Ig : immunoglobuline ; A647 : Alexa Fluor® 647, APC : Allophycocyanine, Cy7 : cyanine 7, FITC : isothiocyanate de fluoresceïne, PE : phycoérythrine.

3.2.2.2. Analyse par cytométrie en flux

Les cellules marquées sont analysées par cytométrie en flux en utilisant un cytomètre en flux de type FACSCanto II (BD Biosciences®). Les données sont analysées à l'aide du logiciel FACS Diva (BD Biosciences®).

Les cellules mortes marquées avec le 7AAD sont d'abord exclues de l'analyse puis la population d'intérêt est repérée par l'expression de la molécule CD45, marqueur pan-leucocytaire. Les différentes sous-populations leucocytaires sont finalement distinguées par leur expression des molécules CD45 et CD11b (Cf. Figure 26). Les résultats sont exprimés en pourcentage de la population d'intérêt par rapport au nombre total de cellules vivantes présentes dans les échantillons tumoraux.

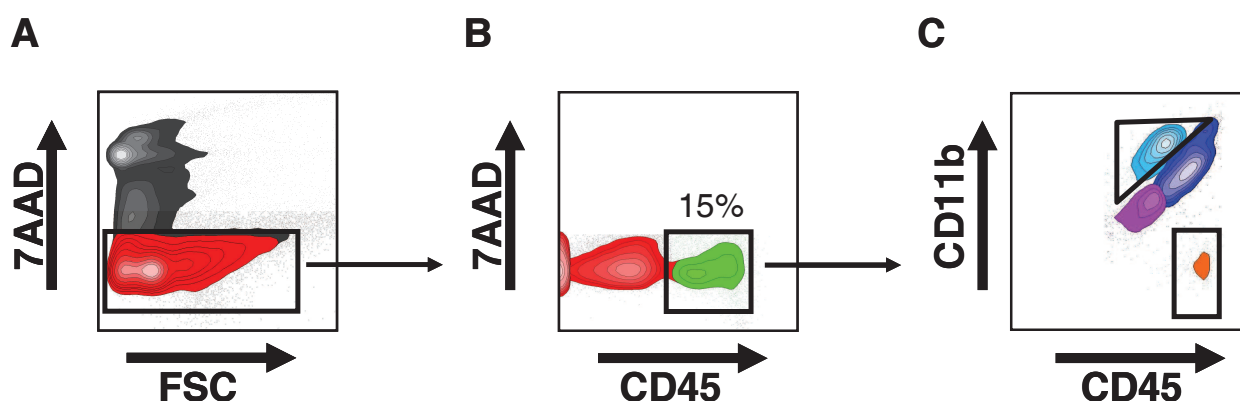


Figure 26 : analyse des populations infiltrantes par cytométrie de flux.

Les cellules issues de prélèvements tumoraux sont préparées comme indiqué dans la partie 'Matériel et méthodes' puis marquées avec des anticorps anti-CD45 et CD11b. Après lavages, les cellules sont incubées avec le 7AAD puis analysées par cytométrie en flux. (A) Les cellules vivantes (en rouge) sont repérées par l'absence de fixation du 7AAD. (B) La population leucocytaire d'intérêt (en vert) est repérée parmi les cellules vivantes par l'expression de la molécule CD45. Le pourcentage des cellules CD45+ parmi les cellules vivantes présentes dans l'échantillon est indiqué au dessus de la fenêtre d'intérêt. (C) Cette population leucocytaire peut être décomposée en différentes sous-populations en fonction de leur profil d'expression des molécules CD45 et CD11b.

3.3. Résultats

3.3.1. Effet de la congélation sur les populations leucocytaires infiltrant les tumeurs

Les échantillons tumoraux issus de patients atteints de tumeurs cérébrales ont été dissociés puis congelés en HSA 10% DMSO pour garder les cellules intactes. Afin de vérifier l'absence de biais lié à cette congélation, nous avons dans un premier temps testé la présence de populations leucocytaires dans 5 échantillons tumoraux avant et après congélation. Comme indiqué dans les figures 27 et 28B, le pourcentage des cellules CD45+ infiltrant les tumeurs reste identique après congélation comparé à celui obtenu sur les échantillons fraîchement préparés.

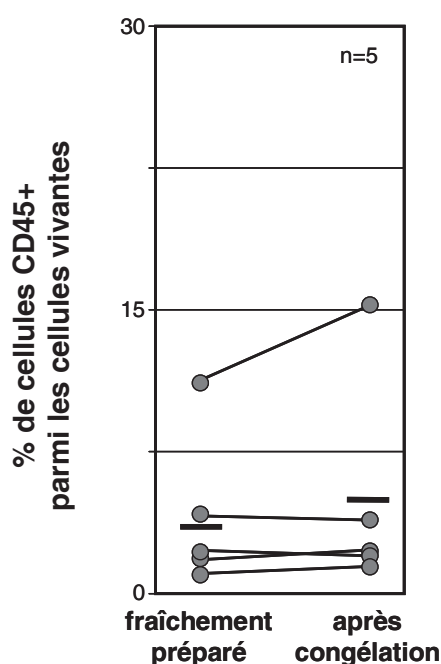


Figure 27 : comparaison du pourcentage de cellules leucocytaires dans les prélèvements de GBM fraîchement préparés et obtenus après décongélation.

Les cellules fraîchement isolées ou décongelées sont analysées comme indiqué dans la figure 28. Les résultats obtenus avec 5 prélèvements tumoraux différents sont exprimés en pourcentage de cellules CD45+ parmi l'ensemble des cellules vivantes testées.

De même, la répartition des sous-populations leucocytaires selon leur expression des molécules CD45 et CD11b reste inchangée sur les échantillons issus des tumeurs fraîches ou des même tumeurs après décongélation (Cf. Figure 28C).

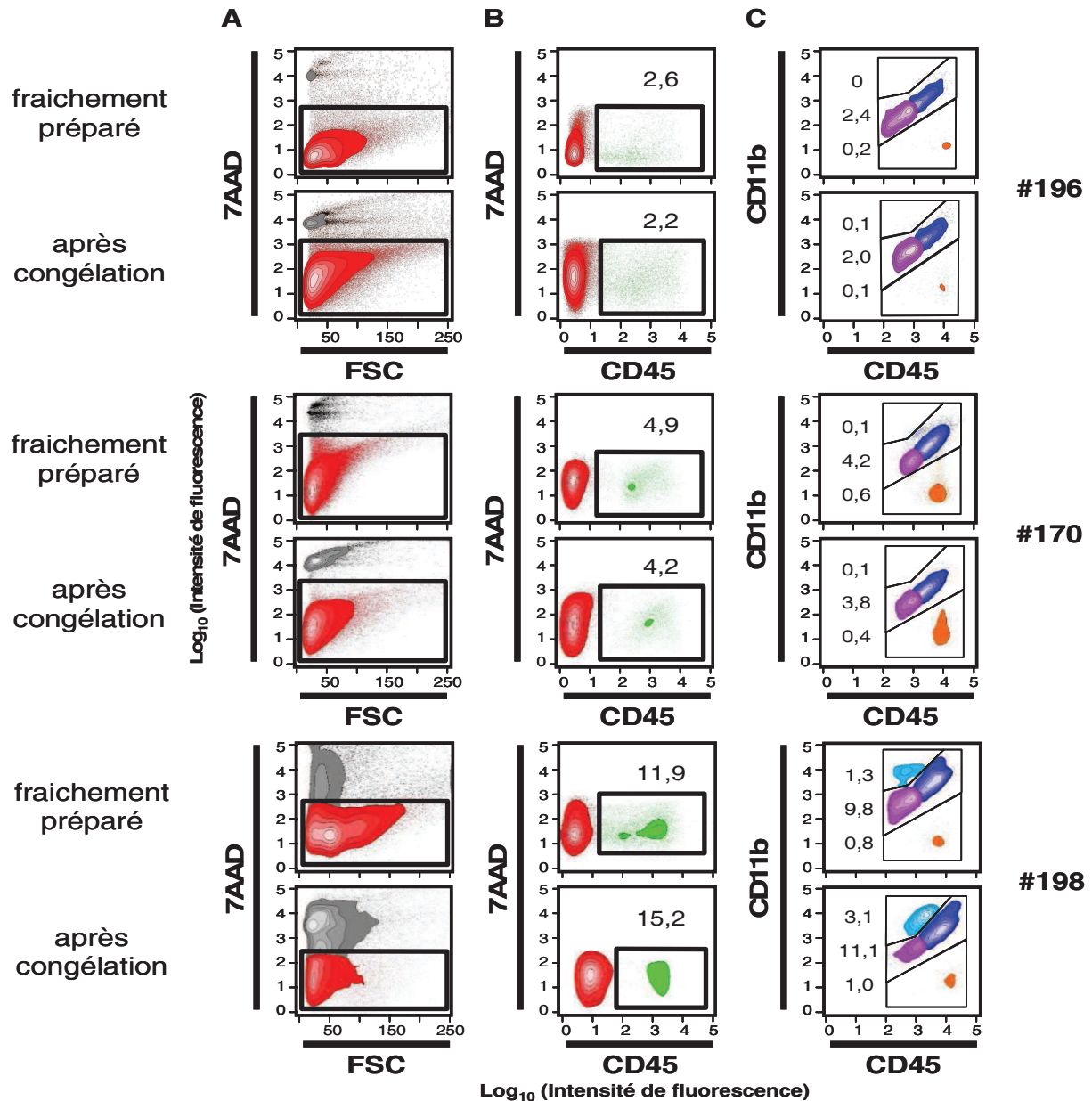


Figure 28 : comparaison des sous-populations leucocytaires dans les prélèvements de GBM fraîchement préparés et obtenus après décongélation.

Les cellules fraîchement isolées ou décongelées sont lavées, marquées avec des anticorps spécifiques anti-CD45 et CD11b puis analysées par cytométrie en flux. Les cellules vivantes sont repérées par exclusion du 7AAD (A); les leucocytes, parmi les cellules vivantes par l'expression du marqueur CD45 (B) et les différentes sous-populations leucocytaires à partir des cellules CD45+ vivantes par l'expression de la molécule CD11b (C). Les valeurs indiquées près les fenêtres correspondent aux pourcentages de cellules retrouvées dans les zones d'intérêt parmi l'ensemble des cellules vivantes testées.

3.3.2. Variation de la proportion de la population leucocytaire infiltrant les tumeurs cérébrales

3.3.2.1. Influence du grade sur la population leucocytaire infiltrant les tumeurs cérébrales

Nous avons ensuite étudié la proportion de cellules CD45+ parmi des cellules issues de différents prélèvements tumoraux : GBM (n=73), gliomes de grade III (n=12), de grade II (n=8). Une forte hétérogénéité de la proportion des cellules leucocytaires infiltrant les GBM est observée (de 0,15% à 44,6% - moyenne = 10,0%) (Cf. Figures 29 et 30B).

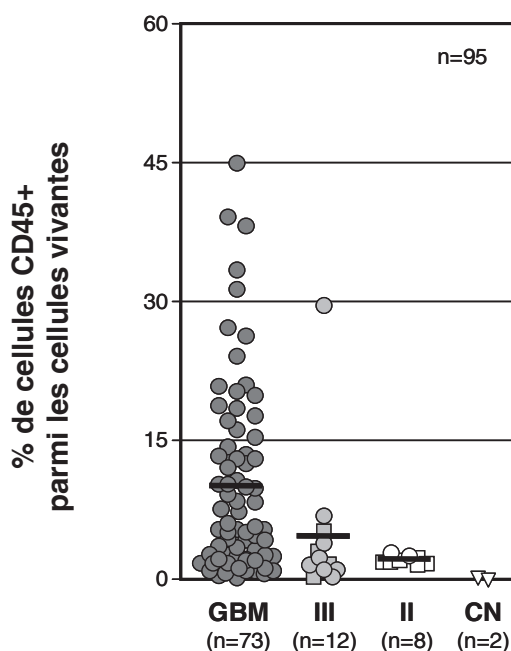


Figure 29 : présence de sous-populations leucocytaires dans les prélèvements de tumeurs cérébrales.

Les cellules fraîchement isolées ou décongelées sont analysées comme indiqué dans la figure 28. Les résultats obtenus avec les prélèvements de GBM, de tumeurs cérébrales de grade III et II, et de cortectomie d'épilepsie (CN) sont exprimés en pourcentage de cellules CD45+.

Non seulement, une forte hétérogénéité de la population leucocytaire est observée dans les GBM mais également des sous-populations leucocytaires, avec la présence d'une infiltration plus ou moins forte de microglie/macrophage plus ou moins associée à une infiltration de polynucléaires et/ou de lymphocytes (Cf.Figures 30B et 30C).

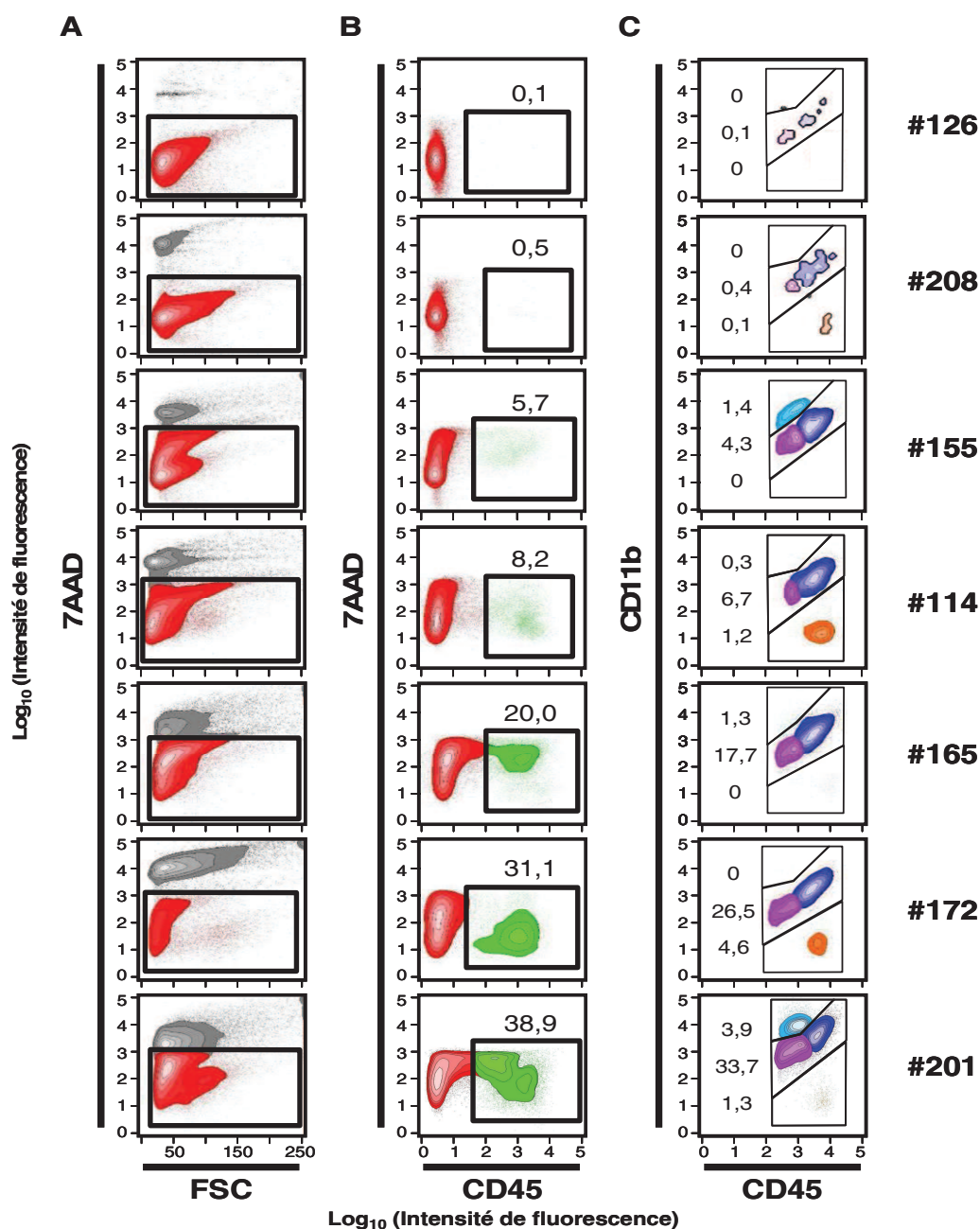


Figure 30 : présence de sous-populations leucocytaires dans les prélèvements de GBM.

Les cellules décongelées sont lavées et analysées comme indiqué dans la figure 28.

Les valeurs indiquées dans les fenêtres correspondent aux pourcentages de cellules retrouvées dans les zones d'intérêt parmi l'ensemble des cellules vivantes testées.

De façon remarquable, même si le nombre de tumeurs étudié est moindre, le pourcentage de cellules CD45+ retrouvées dans les tumeurs cérébrales de grade II et III semble inférieur à celui des GBM (moyenne = 1,93% et 4,57% respectivement) (Cf. Figure 29A et 31B).

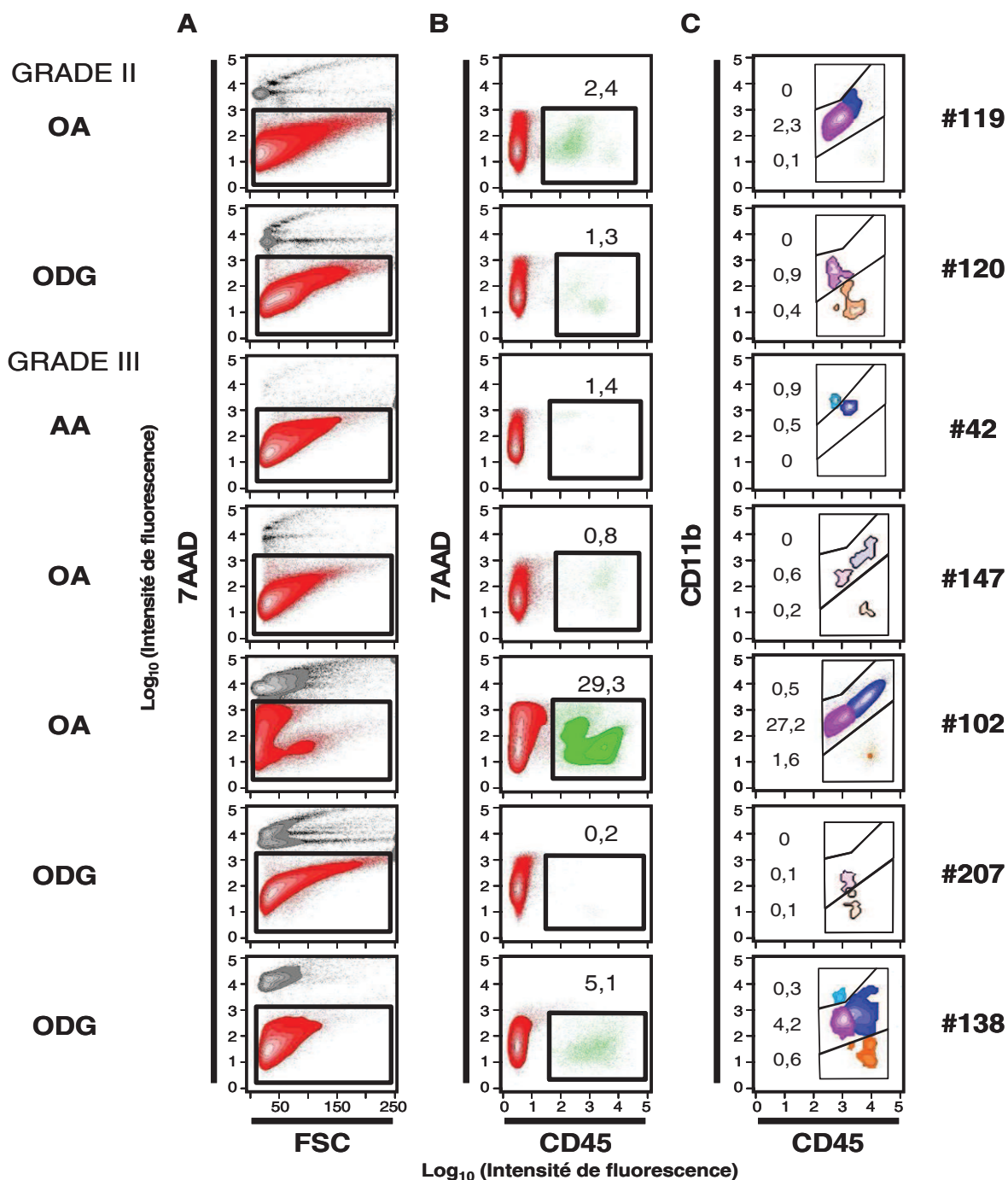


Figure 31 : présence de sous-populations leucocytaires dans les prélèvements de gliomes de grades II et III.

Les cellules décongelées sont lavées et analysées comme indiqué dans la figure 28. Les valeurs indiquées dans les fenêtres correspondent aux pourcentages de cellules retrouvées dans les zones d'intérêt parmi l'ensemble des cellules vivantes testées.

3.3.2.2. Absence de la population leucocytaire infiltrant les tumeurs cérébrales dans les zones péri-tumorales et les cortectomies non-tumorales

Nous avons testé si la présence de la population leucocytaire CD45+ est également retrouvée dans le parenchyme péri-tumoral ou bien celui de cortectomies issues de chirurgie d'épilepsie (en marge du site atteint). Nous avons observé une faible infiltration de cellules CD45+ dans les zones péri-tumorales issues de différents prélèvements de GBM (n=10) et d'un gliome de grade III alors que des cellules CD45+ infiltraient les zones tumorales correspondantes (en moyenne 1,0% dans les zones péri-tumorales contre 11,4% dans les zones tumorales) (Cf. Figures 32).

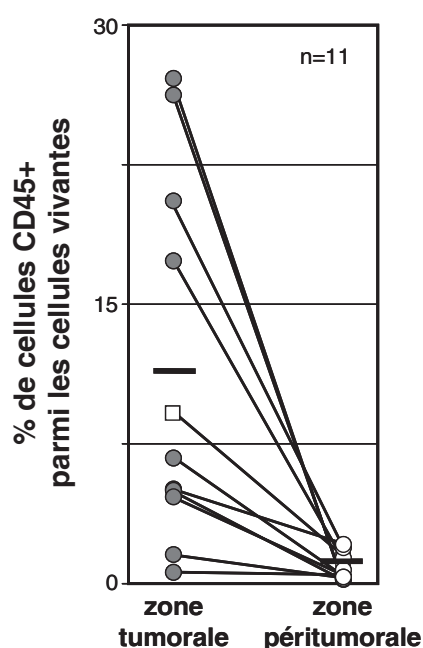


Figure 32 : présence de sous-populations leucocytaires dans les zones tumorales et péri-tumorales de prélèvements issus de tumeurs cérébrales.

Les cellules fraîchement isolées ou décongelées sont analysées comme indiqué dans la figure 28. Les résultats obtenus avec les prélèvements de GBM (cercle ○) et d'un gliome de grade III (carré □) sont exprimés en pourcentage de cellules CD45+ parmi l'ensemble des cellules vivantes testées.

De même, nous n'avons pas observé de cellules CD45+ dans les prélèvements issus de cortectomies d'épilepsie (n=2) (Cf. Figure 29).

3.3.3. Phénotypage des sous-populations leucocytaires infiltrant les GBM

Nous avons montré une infiltration variable de cellules CD45+ dans les GBM. Parmi ces cellules, plusieurs sous-populations peuvent être distinguées par leur expression des molécules CD45 et CD11b entre autres (Cf. Figure 28C).

La sous-population majoritaire, retrouvée dans tous les prélèvements de GBM infiltrés en leucocytes est la population hétérogène CD45+ CD11b+ (Cf. Figures 29 et 30C, en bleu foncé et violet) (supérieur à 2% dans 50 GBM sur 73). Deux autres sous-populations sont retrouvées moins fréquemment : la sous-population CD45^{fort} CD11b^{faible} (supérieur à 2% dans 7 GBM sur 73) et la sous-population CD45^{faible} CD11b^{fort} (supérieur à 2% dans 9 GBM sur 73) correspondant respectivement à la population lymphocytaire colorée en orange et granulocytaire colorée en bleu clair.

Nous allons décrire les différentes sous-populations leucocytaires dans les prochains sous chapitres.

3.3.3.1. Phénotypage de la sous-population majoritaire CD45+ CD11b+

Il a été précédemment décrit une infiltration importante des cellules microgliales/macrophagiques dans les tumeurs cérébrales (361;362;392), sans que les auteurs ne les différencient en cytométrie. En effet, la sous-population CD45+ CD11b+ est hétérogène, elle correspond à 2 types cellulaires : les macrophages ou monocytes et les cellules de la microglie.

La sous-population a donc été testée dans notre analyse pour l'expression des molécules CD14, CD64, CD163, CD33, CD11c, CD105 et HLA-DR exprimées par les cellules de type monocytes/macrophages.

Comme le montre la figure 33, toutes les cellules CD45+ CD11b+ expriment les molécules CD64, HLA-DR, CD11c et CD105. Une grande majorité d'entre-elles expriment CD14 et CD33 (sauf les cellules du prélèvement #150). Une plus grande variabilité dans l'expression des molécules CD163 et CD16 est observée selon les tumeurs.

Au sein de cette sous-population, les niveaux d'expression des molécules CD45+ CD11b+ permettent d'identifier deux groupes de cellules. Le groupe exprimant fortement CD45 et CD11b expriment également les molécules CD14, CD64, CD33, CD11c, CD16 et CD105 à des niveaux plus forts évoquant l'état activé des cellules.

Contrairement à Iba1 en IHC, qui serait plus spécifique de la microglie, aucun marqueur commercialisé pour la cytométrie de flux ne permet pas de différencier les macrophages de la microglie. Bien qu'arbitrairement nous avons voulu séparer visuellement par deux couleurs différentes, la microglie non activée, représentée par des points violets, correspondant à des cellules exprimant moins fortement CD45+ et CD11b+ et exprimant moins les marqueurs d'activation (CD163, HLA-DR, CD11c) que la microglie activée ou les macrophages/monocytes activés (représentés par des points bleus foncés).

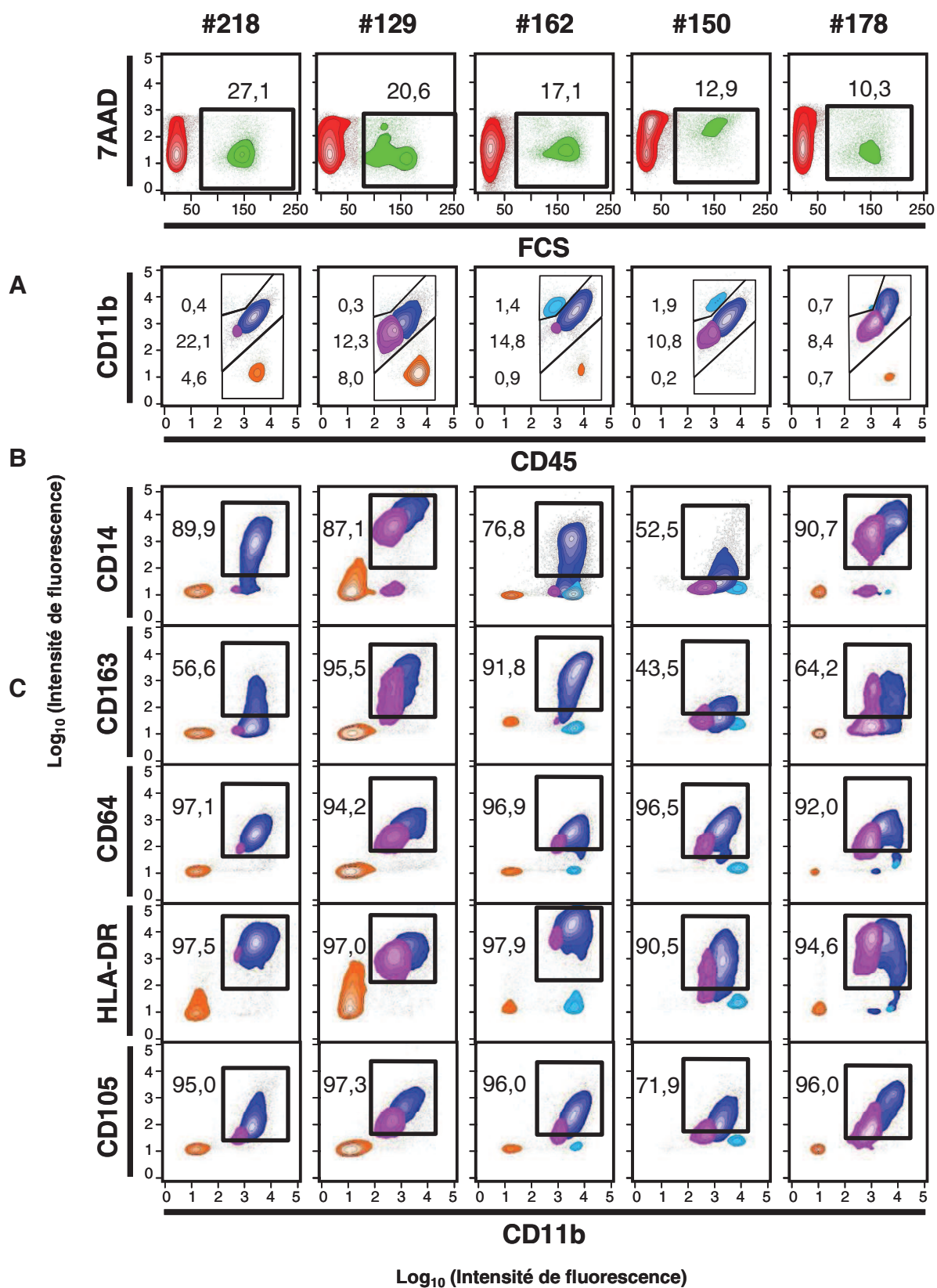


Figure 33 : Phénotypage de la sous-population CD45+ CD11b+ infiltrant les GBM.
Cf légende en fin de deuxième partie de la figure 33.

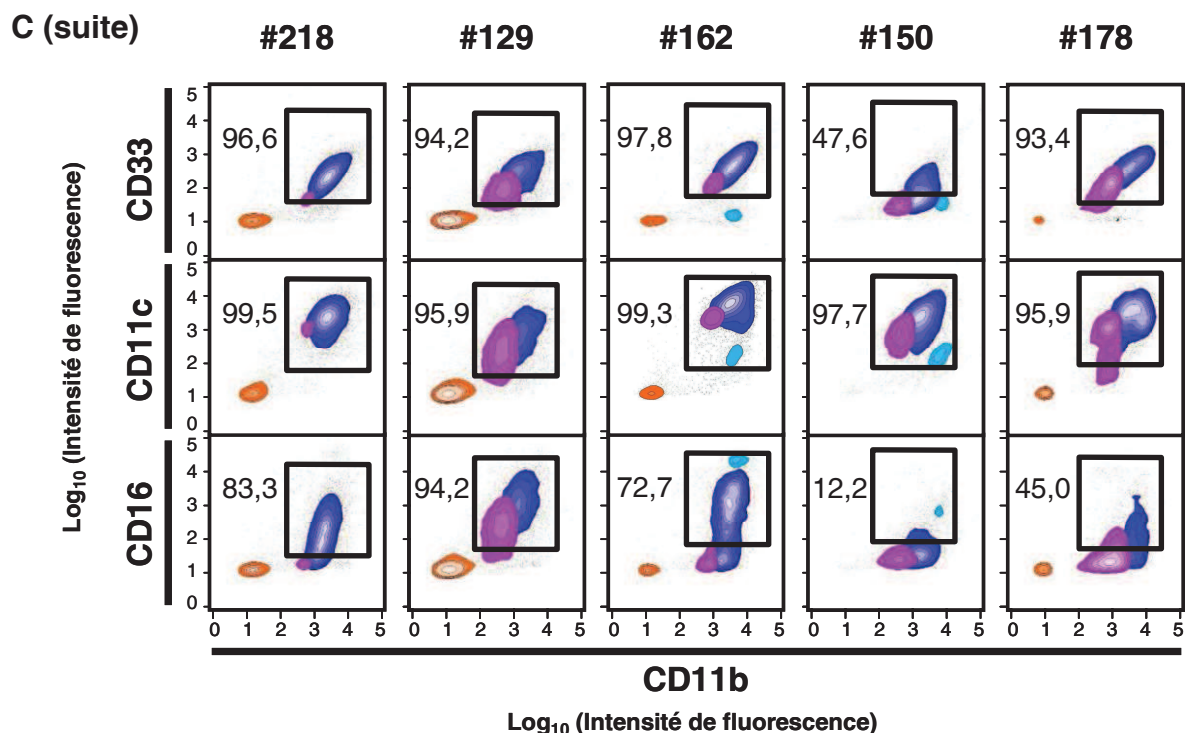


Figure 33 (suite): Phénotypage de la sous-population CD45⁺ CD11b⁺ infiltrant les GBM.

Les cellules sont analysées comme indiqué dans la figure 28. Elles sont ensuite marquées avec différents anticorps dirigés contre les molécules indiquées en ordonnée. Les valeurs indiquées dans les fenêtres correspondent aux pourcentages de cellules retrouvées dans les zones d'intérêt parmi l'ensemble des cellules vivantes testées (A et B) ou parmi les cellules CD45⁺ CD11b⁺ (C).

3.3.3.2. Phénotypage de la sous-population CD45^{faible} CD11b^{fort}

Comme indiqué ci-dessus, la sous-population CD45^{faible} CD11b^{fort} (représentée par les points bleu clair) est retrouvée dans moins de 13% des tumeurs testées (% CD45^{faible} CD11b^{fort} supérieur à 2%).

Comme le montre la figure 33C, ces cellules n'expriment pas les molécules CD14, CD64, CD163, CD33, CD105 et HLA-DR (Cf. Figure 33C) mais expriment CD66b, CD15 et CD11c, molécules retrouvées sur les granulocytes (Cf. Figure 34C).

De même, elles expriment des niveaux variables de la molécule CD16, qui correspond au récepteur FcγRIIIA, présents non seulement à la surface des monocytes/macrophages mais aussi des polynucléaires neutrophiles.

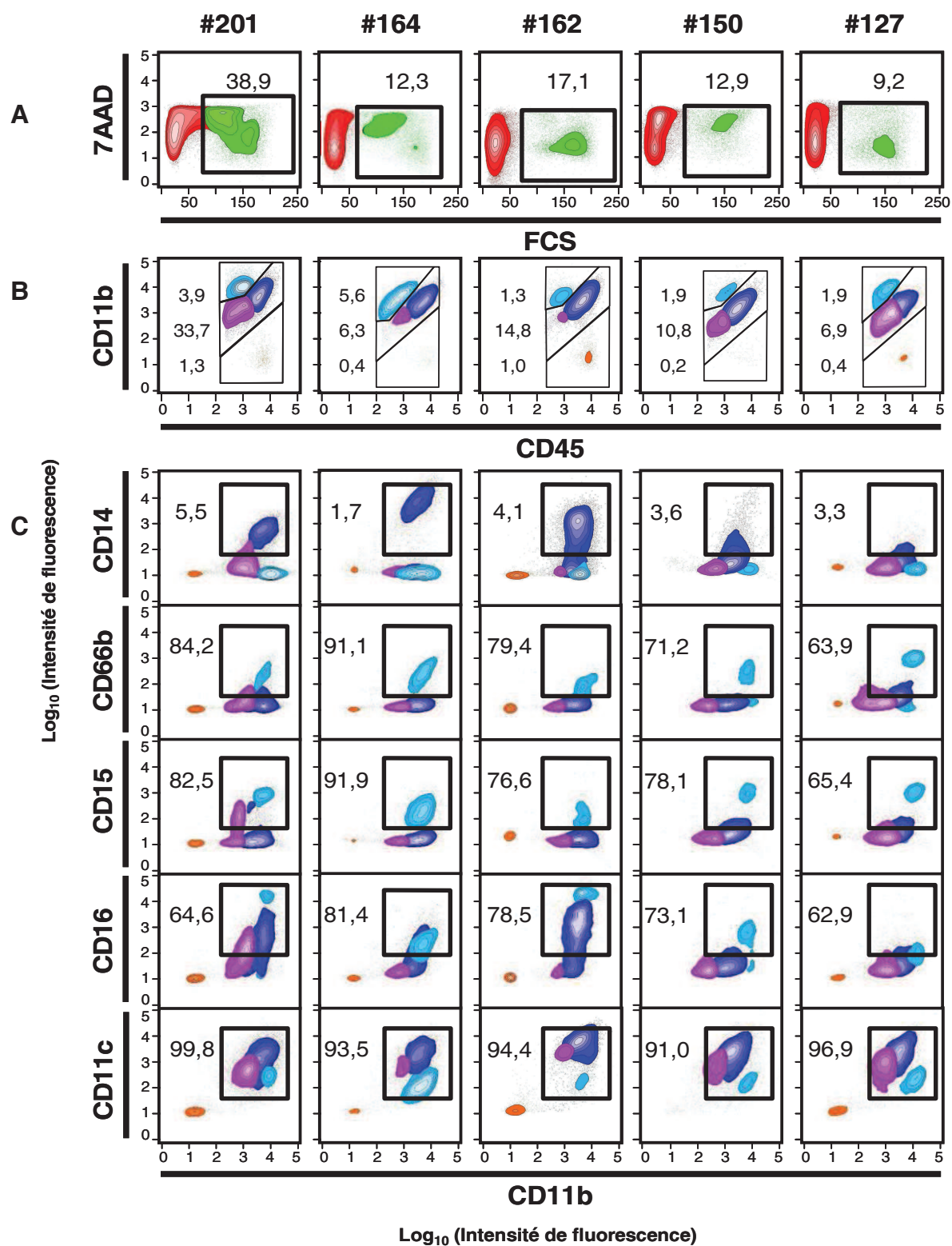


Figure 34 : phénotypage de la sous-population CD45^{faible} CD11b^{fort} infiltrant les GBM.

Les cellules sont analysées comme indiqué dans la figure 28. Les valeurs indiquées dans les fenêtres correspondent aux pourcentages de cellules retrouvées dans les zones d'intérêt parmi l'ensemble des cellules vivantes testées (A et B) ou parmi les cellules CD45^{faible} CD11b^{fort} (C).

3.3.3.3. Phénotypage de la sous-population CD45^{fort} CD11b^{faible}

La sous-population CD45^{fort} CD11b^{faible} (représentée par des points oranges) est retrouvée dans moins de 10% des tumeurs testées (% CD45^{faible} CD11b^{fort} supérieur à 2%).

Ces cellules n'expriment aucun des marqueurs utilisés précédemment (Cf. Figures 33C et 34C), excepté pour la tumeur #129 la molécule HLA-DR à des niveaux très faibles.

Nous avons alors testé les molécules CD19, NKp46 et CD3 exprimées respectivement par les lymphocytes B, NK et T (Cf. Figure 35). La majorité des cellules CD45^{fort} CD11b^{faible} expriment le marqueur CD3 des lymphocytes T mais pas les molécules CD19 des lymphocytes B ni NKp46 des cellules NK (Cf. Figure 35C). La proportion des lymphocytes T CD4 et CD8 varie selon les tumeurs. Pour la tumeur #129, les lymphocytes T sont principalement des lymphocytes T CD8 alors qu'inversement pour la tumeur #108, ce sont plutôt des lymphocytes T CD4.

Comme il a précédemment été rapporté que des lymphocytes T CD4 régulateurs étaient présents sur le site des tumeurs cérébrales, nous avons étudié l'expression des molécules CD25 et CD127 sur ces cellules CD3⁺ CD4⁺ (Cf. Figure 35D). De façon surprenante, nous n'avons pas observé de cellules CD3⁺ CD4⁺ CD25^{fort} CD127^{faible} ou - (moins de 2 %) caractérisant les LTreg.

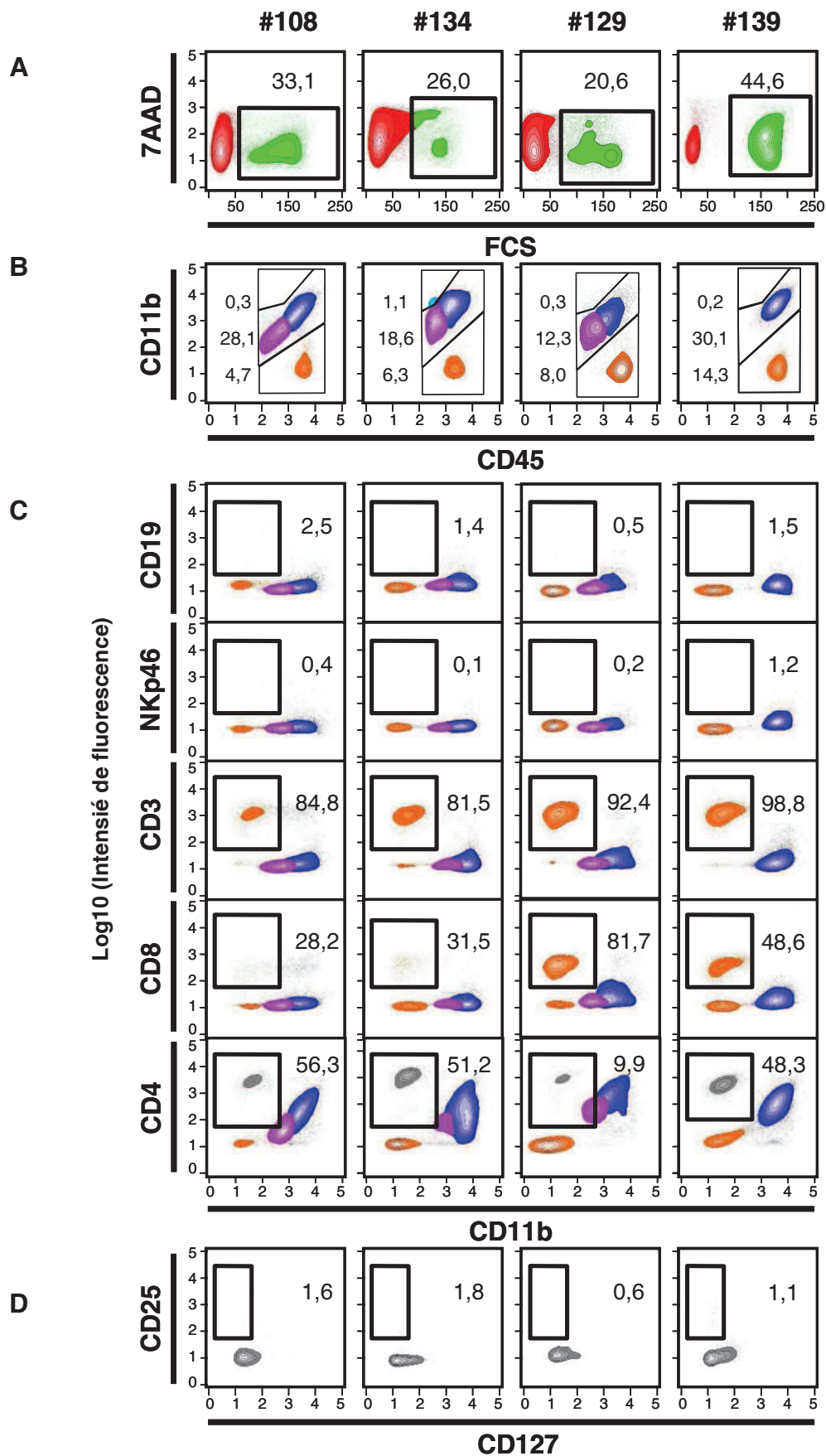


Figure 35 : Phénotypage de la sous-population CD45^{fort} CD11b^{faible} infiltrant les GBM.

Les cellules sont analysées comme indiqué dans la figure 28. Les valeurs indiquées dans les fenêtres correspondent aux pourcentages de cellules retrouvées dans les zones d'intérêt parmi l'ensemble des cellules vivantes testées (A et B) ; parmi les cellules CD45^{fort} CD11b^{faible} (C) ou parmi les cellules CD45^{fort} CD11b^{faible} CD3⁺ (D).

L'infiltration de cellules immunes de notre étude est résumée dans le tableau 10 en termes de moyenne, médiane et valeurs extrêmes en pourcentage de cellules viables.

Infiltration (% de cellules viables)	microgliale/macrophagique	lymphocytaire	polynucléaire
moyenne	7,76	1,04	1,09
médiane	5,09	0,41	0,35
minimum	0,07	0,02	0,00
maximum	33,62	14,24	12,29

Tableau 10 : récapitulatif de l'infiltration de cellules immunes dans 73 GBM.

Les valeurs moyennes, médianes, et extrêmes des infiltrations sont exprimées en pourcentage de cellules viables retrouvées en cytométrie de flux.

3.3.4. Relation entre l'infiltration leucocytaire et les données cliniques des patients atteints de GBM

3.3.4.1. Influence de l'âge des patients sur la population leucocytaire infiltrant les GBM

Le système immunitaire étant connu pour être moins efficace avec l'âge, nous avons donc étudié l'âge moyen des patients chez 20 patients ayant une faible (inférieure à 1,8% de cellules CD45+) ou forte infiltration leucocytaire (entre 16,0 et 44,6% de cellules CD45+).

L'âge est légèrement plus élevé dans le groupe à faible infiltration avec une moyenne autour de 66 ans versus 62 ans pour les patients ayant une plus forte infiltration leucocytaire (avec des âges extrêmes au diagnostic allant de 49 à 80 versus 48 à 75 ans respectivement). Cette différence d'âge entre les 2 groupes de patients ayant soit une forte ou une faible infiltration leucocytaire CD45+ n'est pas statistiquement significative selon le test non paramétrique de Wilcoxon.

3.3.4.2. Influence de la prise de corticoïdes en préopératoire sur la population leucocytaire infiltrant les GBM

Nous avons aussi recherché un impact de la corticothérapie sur l'infiltration leucocytaire dans les GBM. Nous avons étudié ces deux groupes de patients ayant soit une forte infiltration leucocytaire (entre 16,0 et 44,6% de cellules CD45+) soit une faible infiltration (inférieure à 1,8% de cellules CD45+).

Nous n'avons pas trouvé de lien entre l'absence ou non d'une corticothérapie en préopératoire et le niveau d'infiltration leucocytaire. En effet, 2 patients sur 10 de chacun des groupes n'ont pas reçu de corticoïdes avant le passage au bloc opératoire.

De plus, le groupe de patients ayant la plus forte infiltration leucocytaire dans la tumeur a été traité en moyenne plus longtemps (avec une durée de 10,3 jours versus 8 jours) et avec des plus fortes doses de corticoïdes (avec une posologie totale de 1178 mg versus 671 mg) comparé au groupe ayant un faible infiltrat leucocytaire (Cf. Figure 36A et 36B).

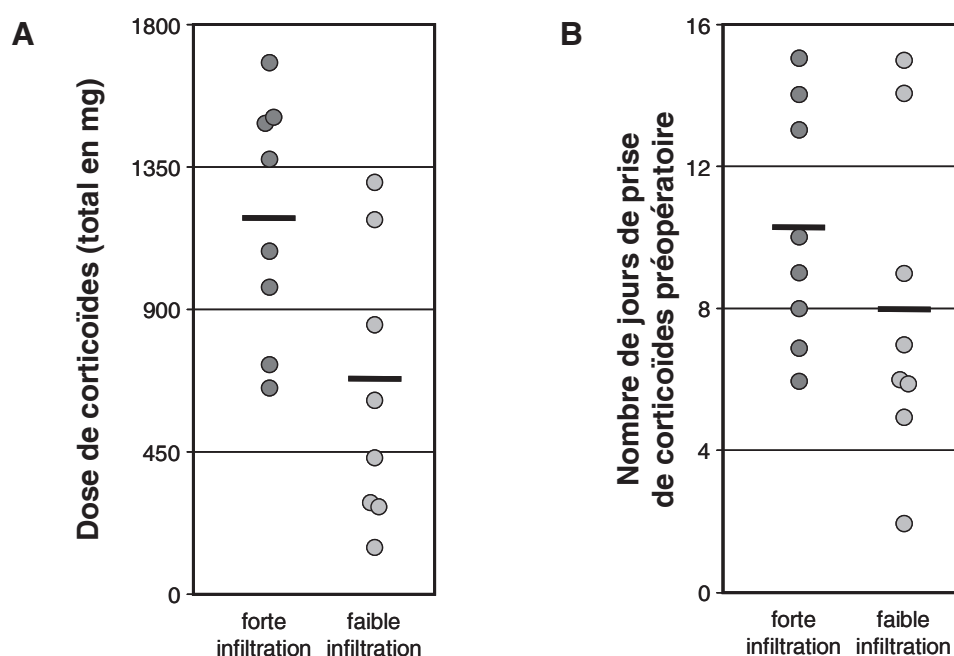


Figure 36 : Influence de la prise de corticoïdes sur la population leucocytaire infiltrant les GBM. La posologie (A) et la durée (B) du traitement par les corticoïdes ont été rapportées pour les 10 patients ayant une importante infiltration leucocytaire (de 16 à 45 % des cellules vivantes) et les 10 patients ayant une faible infiltration leucocytaire (de 0,4 à 1,7 % des cellules vivantes).

La différence de posologie et de durée de la corticothérapie pré-opératoire n'est pas statistiquement significative selon le test non paramétrique de Wilcoxon entre les 2 groupes de fort et de faible niveau d'infiltration leucocytaire CD45+ dans la tumeur. De même aucune différence significative de posologie et de durée de traitement par corticoïdes n'est retrouvée lors de la comparaison des groupes de forte et faible infiltration des sous-populations microgliales/macrophagiques, polynucléaires et lymphocytaires.

Par ailleurs, aucun des 20 patients étudiés n'avait de traitement immunosuppresseur avant le geste chirurgical. A noter qu'un des patients qui avait une infiltration importante (autour de 18,6% de cellules viables CD45+) avait un antécédent de syndrome myéloprolifératif non traité (thrombocyémie) au moment du diagnostic de GBM.

3.3.4.3. Influence de l'infiltration leucocytaire sur la survie des patients atteints de GBM

Nous avons ensuite étudié l'impact de l'infiltration leucocytaire sur la survie des 66 patients traités pour un glioblastome, dont la survie est connue.

Nous avons comparé la survie des patients appartenant à deux groupes différents d'infiltration forte ou faible de cellules immunes selon la méthode de Kaplan-Meier par un test du log-rank. Les deux groupes sont définis dans un premier temps selon la valeur médiane de l'infiltration en leucocytes totaux, lymphocytes, cellules microgliales-macrophagiques et polynucléaires. Le premier groupe de patient présente une infiltration cellulaire supérieure à la valeur médiane d'infiltration et le deuxième groupe une infiltration inférieure ou égale à cette valeur médiane.

Nous avons également comparé la survie entre les patients du 1^{er} versus du 4^{ème} quartile de valeurs d'infiltration des différentes cellules immunes.

On note une tendance non significative à une meilleure survie en cas d'infiltration leucocytaire CD45+ comme le souligne la séparation des 2 courbes de survie. La courbe de survie des patients ayant une forte infiltration leucocytaire (supérieure à la valeur médiane de l'infiltration en cellules CD45+ c'est-à-dire 5,35% cellules viables) est de couleur rouge et celle des patients ayant une faible infiltration (inférieure ou égale à la valeur médiane d'infiltration de cellules CD45+) est représentée en bleu (Cf. Figure 37). La comparaison de la survie des patients du 1^{er} versus du 4^{ème} quartile de valeurs d'infiltration en cellules CD45+ n'est également pas significative.

Survie globale en fonction de l'infiltration de cellules CD45 +

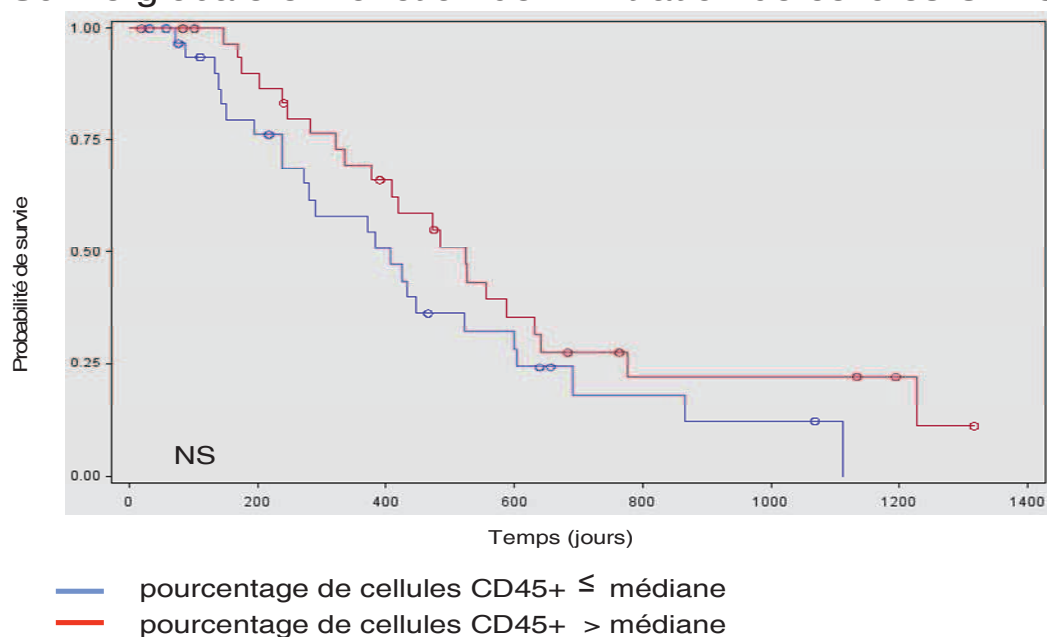


Figure 37 : courbe de survie en fonction de l'infiltration CD45+.

Les courbes de survie selon la méthode de Kaplan-Meier des 66 patients traités pour un GBM sont représentées en rouge pour ceux qui ont une infiltration leucocytaire CD45+ supérieure à la médiane de l'infiltration et en bleu si l'infiltration est inférieure ou égale à la médiane. La différence n'est pas significative statistiquement selon le test du log-rank.

Aucune différence pronostique significative n'est retrouvée concernant la comparaison des deux groupes d'infiltration faible ou forte de macrophage/microglie et de polynucléaire en comparant les groupes séparés selon la médiane de valeurs d'infiltration ou le groupe du 1^{er} versus le 4^{ème} quartile de valeurs d'infiltration de macrophage/microglie et de polynucléaire.

Seule la présence de la population lymphocytaire induit une différence significative de survie selon la méthode de Kaplan-Meier, avec un log-rank significatif $p < 0,02$ (Cf. Figure 38). La courbe de survie des patients ayant une forte infiltration lymphocytaire (supérieure à la valeur médiane d'infiltration lymphocytaire c'est-à-dire 0,36% de cellules viables) est représentée en rouge et celle des patients ayant une faible infiltration (inférieure ou égale à la médiane d'infiltration lymphocytaire) en bleu.

Survie globale en fonction de l'infiltration de lymphocytes

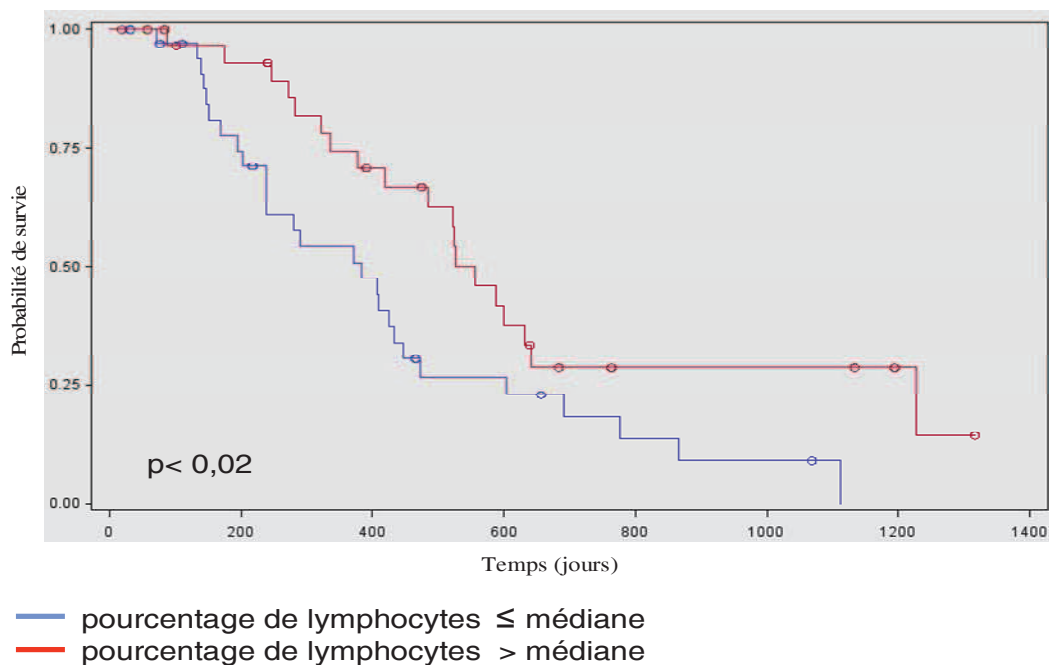


Figure 38 : courbe de survie en fonction de l'infiltration lymphocytaire.

Les courbes de survie selon la méthode de Kaplan-Meier des 66 patients traités pour un GBM sont représentées en rouge pour ceux qui ont une infiltration lymphocytaire supérieure à la médiane de l'infiltration lymphocytaire (médiane=0,34) et en bleu si l'infiltration est inférieure ou égale à la médiane. La différence est significative statistiquement avec un $p < 0,02$ selon le test du log-rank.

Notre analyse retrouve donc un meilleur pronostic statistiquement significatif en cas d'infiltration lymphocytaire élevée, et une tendance non significative pronostique positive en cas d'infiltration leucocytaire CD45+ élevée.

3.4. Discussion

Dans notre étude, nous avons mis en évidence une infiltration de cellules immunitaires dans les gliomes notamment les GBM contrairement à la zone péri tumorale et aux cerveaux non tumoraux comme ce qui est décrit dans la littérature (360;391).

Cette infiltration de cellules immunes est plus fréquemment retrouvée dans le GBM par rapport aux gliomes de plus bas grade, conformément à la littérature (192;355;357;364;399;417;545). Lohr et *al.* rapportent une corrélation entre l'infiltration de cellules immunes et la perméabilité de la BHE. Les hypothèses sont le passage plus facile des chimiokines et des cellules immunes lors de la rupture de BHE (546). L'infiltration lymphocytaire T est associée à l'expression des molécules d'adhésion notamment la molécule d'adhésion intercellulaire 1 (en anglais intercellular adhesion molecule ICAM-1) et vasculaire 1 (en anglais vascular cell adhesion molecule 1 VCAM-1), qui sont tous les deux colocalisés avec les marqueurs des cellules endothéliales dans les échantillons de GBM. Le TGF diminue l'expression d'ICAM-1 et VCAM-1 dans les cellules endothéliales de GBM et son blocage favorise l'infiltration lymphocytaire T en restaurant l'expression des molécules d'adhésion. La concentration des facteurs de croissance angiogénique, notamment TGF, a été rapportée plus élevée dans les gliomes de hauts grades, ce qui expliquerait la corrélation entre le grade et l'infiltration de cellules immunes (192;192;355;357;364;399;417;545).

Chaque infiltration de cellules immunes retrouvée dans notre étude est au moins composée d'une infiltration macrophages/microglie, plus ou moins associée à une infiltration lymphocytaire et/ou de polynucléaires.

3.4.1. Microglie macrophage

Nous retrouvons la présence d'une infiltration par les cellules macrophagiques/microgliales CD45+ CD11b+ dans l'ensemble des 73 échantillons de GBM analysés, dont 50 ont une infiltration supérieure à 2% des cellules viables en cytométrie de flux. Cette infiltration correspond à 7,76 % des cellules viables en moyenne avec une infiltration maximale de plus d'un tiers de l'ensemble des cellules viables.

Ces données sont comparables à l'étude publiée récemment par Parney et *al.* , sur 9 GBM, pour laquelle il est retrouvé une infiltration de cellules CD45^{faible}/CD11b+ de 1,65% parmi les cellules viables et une infiltration de cellules CD45^{fort} CD11b+ de 6,2 % (360). Hussain et *al.* ont rapporté une infiltration moyenne de cellules CD45+/CD11b+ de 0,8 % de l'ensemble des cellules du GBM. Il est à préciser que dans cette étude, il n'y a pas eu d'exclusion des cellules mortes, ce qui peut entraîner des biais, les cellules mortes pouvant fixer les anticorps de manière non spécifique (363).

L'infiltration microgliale/macrophagique a été également étudiée en IHC dans la littérature, elle peut correspondre, comme nous le rapportons également dans notre étude, jusqu'au tiers des cellules composant le GBM (352;354;355;362).

Dans la littérature et dans notre étude, l'infiltration microgliale/macrophagique est plus fréquente et plus forte dans les gliomes de haut grade que dans les gliomes de bas grade et le cerveau normal (185;352;353;355;357;364;545;547).

Quelques auteurs différencient la microglie en IHC, notamment grâce à l'anticorps anti-AIF1 ou anti-Iba1 (548). Iba-1, « ionized calcium binding adaptor molecule » 1 en anglais, est une protéine exprimée dans la microglie, contrairement aux neurones, à l'astroglie, à l'oligodendroglie, et aux fibroblastes *in vitro* et *in vivo* (548). Cependant, plusieurs études

récentes ont rapporté que des lignées monocytaires macrophagiques sont également Iba1+ en IHC (549-551). Ce marqueur ne semble donc pas être spécifique de la microglie. Il est possible de distinguer, en cytométrie en flux, deux populations distinctes, suivant les niveaux d'expression des molécules CD45+ et CD11b+. Les cellules de la microglie à l'état quiescent se différencient des macrophages par l'expression plus faible du CD45 et du CD11b. Par contre, dans un contexte inflammatoire, il devient difficile de distinguer les macrophages des cellules microgliales activées, l'expression du CD45 et du CD11b augmentant alors sur ces dernières. Une population de cellules microgliales « quiescentes » est toujours retrouvée dans nos échantillons, mais celle-ci est généralement minoritaire par rapport aux cellules exprimant plus fortement CD45 et CD11b.

Des facteurs d'activation des macrophages ont été décrits dans la littérature, notamment l'activation classique des macrophages par l'IFN γ et le LPS qui augmente l'expression de CD16, CD64, CD80, CD86, CD32, TLR2 et TLR4 (les macrophages sont dits de type M1 et synthétisent beaucoup d'IL12 et peu d'IL10) et l'activation alternative via IL4 et IL13 ou IL10 qui augmente l'expression de CD163, CD14, CD23, CD206, CD280 (les macrophages sont dits de type M2 et synthétisent beaucoup d'IL10 et peu d'IL12) (552-557). Cependant, il est maintenant admis que cette classification est simpliste, et que les macrophages peuvent présenter un continuum de phénotypes entre ces deux phénotypes extrêmes. Notre étude montre que les cellules définies par une expression plus forte de CD45 et CD11c expriment aussi plus fortement CD16, CD64 et CD14. L'expression de CD163 est par contre variable d'une tumeur à l'autre, les deux sous-populations discriminées sur l'expression de CD45 et CD11c pouvant présenter une forte ou faible expression de ce marqueur. Les cellules exprimant fortement CD45 et CD11c expriment donc différents marqueurs d'activation dont l'intensité d'expression est variable d'un échantillon à l'autre, montrant bien la plasticité de ces cellules phagocytaires suivant leur environnement. Il est difficile d'indiquer, au vue de ces

phénotypes, si ces cellules se rapprochent plus d'un type M1 ou M2. De plus, pour les cellules microgliales que nous avons définies comme « quiescentes », l'expression de CD14 permet dans certains cas de différencier une population positive et une population négative, montrant ainsi qu'il ne s'agit pas d'une population homogène.

Rossi *et al.* , qui retrouve également une infiltration de 100% des gliomes analysés par IHC, ne met pas en évidence de lien avec la survie (361) comme dans notre analyse. Seules 2 équipes mettent en évidence une association avec la survie. Une survie meilleure est rapportée si le ratio entre le nombre de cellules positives par IHC pour CD163 et le nombre de cellules exprimant CD68 est faible ($< 0,30$) (355). La même équipe a récemment montré que les macrophages de type M2 favorisaient la prolifération des cellules tumorales, après contact cellulaire et activation de STAT3. Un ratio important de cellules de type M2 (définies ici par l'expression de CD163 et Iba1) est corrélé à une forte prolifération dans leur série de gliomes de hauts grades, ainsi qu'à une moins bonne survie (359). La seconde équipe trouve par contre une meilleure survie, dans une série de gliomes de hauts grades, si l'infiltration microgliale et macrophagique Iba1+ est supérieure à 100 cellules par champ au grossissement 400 (correspondant au 75^{ème} percentile de la distribution).

De manière théorique, les macrophages au sein d'une tumeur peuvent jouer un rôle positif, via leurs capacités de phagocytose et de présentation. Cependant il existe une littérature foisonnante sur leurs rôles délétères dans différents cancers, leur présence y étant associée à un mauvais pronostic (558). Les macrophages peuvent favoriser les phénomènes d'invasion tumorale et de métastase, ils contribuent aux phénomènes d'angiogénèse et la présence de macrophages de type M2 participe aux phénomènes d'immunosuppression (559). Différents exemples du rôle délétère des cellules microgliales/macrophagiques sont également rapportés pour les tumeurs cérébrales. Dans des modèles animaux, la déplétion de la tumeur en cellules

microgliales/macrophagiques permet de réduire la taille tumorale (379;560). Un lien entre l'infiltration microgliale/macrophagique et la densité vasculaire a été rapporté par Nishie et *al.* ce qui expliquerait la localisation préférentielle des macrophages dans les zones d'hypoxie où ils favorisent avec les cellules gliales la néoangiogenèse (547). Les cellules microgliales/macrophagiques peuvent exprimer PD-L1 (561), IDO (562) et les molécules HLA-G et HLA-E (563). De plus, les cellules CD14⁺ infiltrant les gliomes expriment fortement la molécule TIM4, ce qui leur permet de phagocyter les lymphocytes infiltrants qui expriment la phosphatidyl sérine. TIM4, comme la phosphatidyl sérine, sont surexprimés en condition hypoxique. D'autre part, en co-culture avec des lymphocytes naïfs, les macrophage induisent ceux-ci vers un phénotype et une fonctionnalité de LTreg (564). Les cellules microgliales/macrophagiques agissent également sur les cellules souches tumorales via la production de TGFβ1 qui favorise leur sécrétion de MMP-9 et augmente leur potentiel invasif (565).

Comment dans ce cas expliquer qu'il n'existe pas de lien plus clair entre l'infiltration en cellules microgliales/macrophagiques et la survie ? Les différents phénotypes cellulaires que nous mettons en évidence en cytométrie en flux sont certainement le reflet de fonctionnalités diverses, dépendant du microenvironnement des cellules. Des analyses complémentaires seront donc nécessaires afin de mieux caractériser ces différents contingents cellulaires et explorer leur éventuel impact sur la progression tumorale.

3.4.2. Lymphocytes

Dans la littérature, 17 études retrouvent une infiltration de lymphocytes dans les gliomes.

Le pourcentage de cette infiltration varie d'une étude à l'autre ainsi que la manière de les distinguer. En IHC, les premières études analysaient uniquement la population lymphocytaire

infiltrante dont l'importance était très variable d'une étude à l'autre (380-384;388;391;393;400;402;405).

En cytométrie de flux, deux études rapportent une infiltration lymphocytaire moyenne respectivement dans 10 et 14 GBM de 18 et 0,7% des cellules totales en les distinguant grâce à leur taille et leur structure (398;566) ou à leur taille, leur structure et l'expression de CD3 (398;566). Dans notre étude, l'infiltration lymphocytaire moyenne de 73 GBM est égale à 1,04% des cellules viables, avec des extrêmes entre 0,02% et 14,24%. Comme dans notre analyse, Parney et *al.* excluent les cellules mortes de leur analyse de la population immune infiltrante, et caractérisent les lymphocytes par le phénotype CD45+/CD11b-. Ils trouvent une moyenne d'infiltration d'environ 2,5% sur une effectif de: 9 GBM (360).

Les lymphocytes représentent un contingent important après l'infiltration microgiale/macrophagique (185;352;354;361;363) voire prédominante dans l'analyse de certains cas des gliomes de haut grade (192;195;358;387;389;390;392;401). Le rapport moyen de l'infiltration microgiale/macrophagique sur l'infiltration lymphocytaire est égal à 7,5 dans notre analyse, il varie dans la littérature entre 3 et 6 (352;360;363).

Les lymphocytes correspondent dans notre étude à des lymphocytes T, nous ne rapportons pas d'infiltration de lymphocytes B conformément à la plupart des articles de la littérature (204;354;363;400;401).

Bien que les cellules NK jouent un rôle dans le GBM, comme le souligne le module bleu de co-expression de gènes intitulé « cellules NK et immunité innée » dans notre analyse des gènes immuns, nous ne rapportons pas d'infiltration de cellules NKp46+. L'infiltration de cellules CD56+ ou CD16+ en IHC rapportée dans la littérature est également faible

(352;358;389;390;392;401). Une seule étude décrit une infiltration de cellules exprimant CD56, que ce soit en périvasculaire ou en intratumoral (357).

Nous rapportons une infiltration lymphocytaire principalement T, les contingents CD4+ et CD8+ varient en fonction des GBM analysés. Dans la littérature, une prédominance de LT CD8+ est rapportée en IHC (352;354;357;387;389;391-394;399), mais trois autres études décrivent une infiltration majoritaire de lymphocytes CD4+ (363) dont 2 par cytométrie de flux (190;192). Prins *et al.* a étudié cette infiltration de LT CD8+ en fonction des sous-types moléculaires de GBM : elle semble plus importante en cas de GBM mésenchymateux en comparaison aux GBM proneuraux et associée à une meilleure réponse dans cet essai de vaccination (403). Dans notre analyse, les LT CD8+ n'expriment pas CD25, ils ne sont donc pas activés, comme précédemment décrit par Hussain *et al.* (363).

Nous ne retrouvons pas d'infiltration significative par les LTreg. Deux études réalisées par IHC montrent que 30 à 40% des glioblastomes présentent une infiltration de cellules exprimant FOXP3. Le nombre absolu de cellules positives est cependant faible: pour 20 cellules exprimant CD3 par mm² de coupe, moins de 0,3 cellule expriment FOXP3 dans l'étude de Lohr *et al.* (192;355;357;364;399;417;545) et dans l'étude de Kim *et al.* 0,6 cellule FOXP3+ pour 12,8 cellules CD3+ sont observées par champ (387). Heimberger *et al.* trouvent, dans une série de 52 glioblastomes, que 48% d'entre eux présentent des cellules positives pour FOXP3 et 13% un nombre jugé important de ces cellules au niveau des zones analysées, soit plus de 5. Ce chiffre est difficile à comparer aux autres, aucune harmonisation n'existant quant à la façon de rendre un résultat semi-quantitatif en IHC (567). De plus, de récentes études mettent en évidence que les cellules tumorales peuvent également exprimer FoxP3 dans le cancer du pancréas (568), le mélanome (569), le cancer du sein (570;571), le carcinome hépatocellulaire (572), le cancer urinaire (573), le cancer bronchique (574), et le

cancer colique (575). La mise en évidence de cellules FOXP3 positives par technique d'IHC pourrait donc manquer de spécificité.

Dans les gliomes, la plupart des études ont analysé cette sous-population lymphocytaire par cytométrie de flux, ce qui permet d'étudier plusieurs marqueurs cellulaires de manière concomitante. Cependant, les critères de définition des LTreg ne sont pas toujours identiques. El Andaloussi et *al.* décrivent une infiltration de LT selon des critères de taille structure et l'expression de CD4 et CD25. Parmi leur population de petites cellules, considérées comme étant des lymphocytes, le pourcentage de cellules positives pour CD4 et CD25 augmente selon le grade des gliomes, pour atteindre 25% dans les glioblastomes. Afin de montrer qu'il s'agit de LTreg, ils mettent en évidence par technique de biologie moléculaire l'expression de FOXP3 dans cette population, après tri cellulaire. Il est abusif d'appeler LTreg toutes les cellules CD4+/CD25+, celles-ci étant classiquement définies selon le phénotype CD4+/FoxP3+/CD25^{fort}. De plus, les auteurs n'indiquent pas s'ils ont éliminé les cellules mortes avant analyse. Le chiffre de 25% de LTreg parmi les lymphocytes paraît donc largement sur-estimé (398), Jacobs et *al.* mettent en évidence les LTreg de la manière suivante, dans une série de 83 tumeurs cérébrales, dont 29 glioblastomes: après une sélection sur la taille/structure, les cellules exprimant CD4 sont analysées selon l'expression de CD25 et FOXP3 ou CD127 et FOXP3. Le pourcentage de cellules FoxP3/CD25^{fort}/CD127^{faible} parmi les lymphocytes CD4+ augmente avec le grade des gliomes, pour atteindre une moyenne de 16,5% dans les glioblastomes (397), et Crane et *al.* de manière similaire, sur une série de 20 glioblastomes, montrent qu'en moyenne 38,5% des lymphocytes CD3+/CD4+ sont CD25+/FoxP3+ (395). Il est à noter que pour ces deux études les auteurs ont séparé les cellules par gradient de densité avant analyse en cytométrie de flux. D'autre part, le rendu de résultat en pourcentage de cellules CD4+ ne permet pas de connaître le degré d'infiltration en LTreg. Notre étude se différencie par l'analyse directe des cellules, en excluant les cellules

mortes avant analyse. De plus, nous avons travaillé sur des échantillons congelés, ce qui pourrait donner un biais, bien que nous n'ayons pas noté de différence avant et après congélation quant au nombre total de lymphocytes présents dans les tumeurs.

Les LTreg, qui expriment le facteur de transcription FoxP3 (576-578), sont principalement connus pour être responsables de tolérance par inhibition de la réponse immune antitumorale (579;580). Ils ont une action immunosuppressive via la sécrétion des cytokines IL10 et TGF β ou via l'inhibition par contact des cellules présentatrices d'antigène et des cellules effectrices T (581;582). Les LTreg peuvent être induits par les cellules initiatrices de tumeurs, qui peuvent inhiber également la prolifération des LT (465). Différentes substances sécrétées par la tumeur comme CCL22, IDO, sont susceptibles de les amener dans la tumeur (397;406;583). Les LTreg sanguins de patients atteints d'un gliome ont une expression de gènes différente de celle des volontaires sains, avec une prédominance de gènes impliqués dans la tolérance immune (584).

Brooks et *al.*, Di Lorenzo et *al.* et Palma et *al.* sont les premiers auteurs à rapporter un gain de survie en cas d'infiltration lymphocytaire en 1977 et 1978 (381-383). Différentes études, relativement anciennes et s'appuyant sur des critères morphologiques en histologie, montrent qu'une infiltration lymphocytaire a également un impact sur la survie pour les gliomes (382;383). Plus récemment, il a été montré dans une large série de 108 glioblastomes qu'une infiltration plus importante en cellules CD8+ était observée chez les patients longs survivants. Parmi les différents facteurs pronostiques connus, l'infiltration immunitaire était le facteur le plus fort en analyse multivariée (585). Une autre étude montre que les patients ayant une infiltration lymphocytaires (CD3+/FOXP3-) supérieure à la valeur médiane présentent une meilleure survie. Ceci est également vrai quand on prend en considération les sous-populations CD8+ (CD3+/CD8+/FOXP3-) et CD8- (CD3+/CD8+/FOXP3-) (192).

Donson et *al.* mettent également en évidence une meilleure survie des patients atteints d'un gliome de haut grade en cas d'infiltration supérieure à la valeur médiane par des cellules exprimant CD4 ou CD8. En analyse multivariée une infiltration de cellules immunes lymphocytaire et/ou macrophagique est un facteur indépendant de longue survie en plus de l'indice de Karnofsky (190). Par contre, malgré le rôle délétère potentiellement joué par les LTreg et malgré le fait qu'il ait été montré dans des modèles animaux de gliomes que la déplétion en Treg avait un impact bénéfique sur la survie, aucune étude chez l'homme n'a pour le moment montré un lien net entre l'infiltration en LTreg et la survie (397;567). Ceci est peut être le reflet d'un problème méthodologique pour l'analyse des LTreg, mis en évidence par les résultats contradictoires présentés dans la littérature. Ceci peut aussi indiquer que les LTreg ne sont pas trouvés en nombre suffisant dans les gliomes pour jouer un rôle majeur, ou que les autres mécanismes d'immunomodulation sont prépondérants dans cette pathologie. Quoi qu'il en soit, il existe un certain consensus concernant le rôle bénéfique d'une infiltration lymphocytaire, mettant bien en évidence le rôle de l'immunité dans ces tumeurs et l'intérêt des approches d'immunothérapie visant à augmenter et améliorer cette infiltration lymphocytaire.

3.4.3. Polynucléaires neutrophiles et éosinophiles

Contrairement aux autres contingents immunitaires, les polynucléaires restent relativement peu étudiés au sein des tumeurs. Un regain d'intérêt est cependant noté, depuis qu'il a été montré que les polynucléaires associés aux tumeurs (appelés en anglais tumour-associated neutrophils TAN, par analogie avec les TAM) ainsi que leurs précurseurs myéloïdes peuvent jouer un rôle dans le développement des tumeurs.

Plusieurs études ont mis en évidence par IHC l'infiltration de neutrophiles dans le GBM, en utilisant les marqueurs CD15, myéloperoxydase ou élastase (353;361;417;418), sans que leur

rôle soit clairement élucidé. Dans notre étude, nous avons rapporté une infiltration de cellules CD45+, exprimant fortement CD11b. Ces cellules expriment d'autre part les marqueurs CD15 et CD66b, elles possèdent donc un phénotype comparable à celui des granulocytes circulants. Il est cependant difficile d'affirmer qu'il s'agit de polynucléaires neutrophiles, les polynucléaires éosinophiles présentant des phénotypes relativement proches. L'expression du CD16 pour ce contingent cellulaire, est variable d'une tumeur à l'autre, ce qui pourrait indiquer des stades de maturation variable. En effet, le niveau d'expression de CD16 augmente à la surface des polynucléaires lors de leur maturation. Cette différence d'expression pourrait aussi être le témoin de populations granuleuses différentes, les neutrophiles exprimant plus fortement CD16 que les éosinophiles. Pour certains échantillons, le CD66b semble discriminer deux populations distinctes. Des analyses complémentaires seront donc nécessaires afin de mieux définir cette population CD45+/CD11b^{fort}.

L'infiltration de neutrophiles dans les tumeurs est plutôt associée avec un mauvais pronostic, bien qu'au moins une étude ait montré, dans les cancers gastriques, qu'une forte infiltration de neutrophiles était associée à un meilleur pronostic (422). De plus, dans les gliomes malins la présence d'infiltration de cellules T ou de cellules polynucléées de type éosinophile est associée à une survie plus longue chez des patients vaccinés (404;409).

Les TAN ont dans la plupart des cas un phénotype N2 capable de favoriser la croissance cellulaire tumorale via la sécrétion de cytokines entre autres et d'inhiber la réponse immune antitumorale contrairement au phénotype N1 anti-tumoral (429). De plus, les TAN jouent un rôle important dans l'activation de l'angiogenèse, notamment via la sécrétion de MMP-9 (429;586-588). Il a été montré, dans un modèle murin, que les TAN ont un profil transcriptomique différent des neutrophiles naïfs ou granulocytes correspondant aux MDSC, ces deux dernières populations ayant globalement des profils plus proches (429). Il a été rapporté que l'IL8 réduit la tumorigénicité des cellules cancéreuses humaines *in vivo* (589).

Les neutrophiles activés par l'IL8 changent de forme, dégranulent, génèrent des radicaux libres induisant la mort des cellules tumorales (590). De manière indirecte, IL8 favorise la production de cytokines telles que TNF, IL1, et IFN par les neutrophiles (591). Comme le montre le tableau 2, le gène *IL8* est retrouvé différenciellement exprimé dans les gliomes. Nous avons pu mettre en évidence au laboratoire, par technique ELISA, des taux variables de cette cytokine sur quelques surnageants de broyats tumoraux. Cette augmentation d'IL8 pourrait être la conséquence de la perte de PTEN, conduisant à l'inactivation de STAT3 et ainsi à une augmentation de synthèse d'IL8 (592). Il a également été montré que suite à une activation par FAS Ligand, des cellules tumorales de gliome produisent de l'IL6 et de l'IL8, protégeant les polynucléaires neutrophiles de l'apoptose (593). La présence d'IL8 pourrait ainsi donner un phénotype cytotoxique bénéfique aux TAN, qui seraient de plus résistants à l'apoptose. Par contre, il est également reconnu que l'expression au niveau de la tumeur d'IL8 peut favoriser la croissance tumorale, avec notamment un rôle pro-angiogénique.

Certains auteurs ont cherché à cibler les TAN. Dans un modèle de cancer bronchique, l'utilisation d'un antagoniste de CXCR2, un récepteur fortement impliqué dans la migration des polynucléaires, est associé à une réduction de croissance tumorale (420). Il semble cependant prématuré de proposer ce type de thérapeutique chez l'homme, tant que le rôle des TAN n'est pas mieux connu.

3.4.4. Corticothérapie et âge

Dans notre étude la corticothérapie ne semble pas influencer l'importance de l'infiltration contrairement à d'autres études notamment dans un modèle murin où une dose de dexaméthasone de 0,1 mg/kg/j pendant 7 jours réduit de moitié l'infiltration microgliale et lymphocytaire. L'administration à une posologie de 1 mg/kg/j abolit l'infiltration lymphocytaire (89% d'inhibition) sans modifier de manière supplémentaire la microglie. La

corticothérapie quelle que soit la posologie ne semble pas modifier l'infiltration macrophagique (CD11b/c⁺ fort et CD45⁺ fort) dans cette étude (594). Cependant dans une étude chez l'homme (n=199 patients), aucune différence d'infiltration en lymphocytes n'a été mise en évidence en lien avec l'administration ou non de corticoïdes en préopératoire d'un GBM (405).

L'âge pourrait être un biais également, mais pour l'ensemble des échantillons étudiés, il n'y a pas de différence significative d'âge moyen entre les patients ayant une forte ou une faible infiltration leucocytaire au niveau du GBM.

4. CONCLUSION

Nous avons mis en évidence des profils immunologiques différents entre le cerveau normal et le GBM. Mais le nombre de gènes différentiellement exprimés est trop élevé (473 gènes) pour définir une signature simple et reproductible. Ces données confirment la mise en route d'une réaction immunitaire au sein du microenvironnement tumoral. Par ailleurs, bien que les GBM soient hétérogènes, aucune différence de profil immunologique robuste n'a pu être validée de manière reproductible par différentes méthodes d'établissement de classes et surtout les sous-groupes définis n'ont pas d'impact sur la survie globale. Les gènes différentiellement exprimés interviennent à la fois lors des réponses immunes innée et acquise et pourraient, entre autres, refléter l'infiltration par différentes cellules immunes (lymphocytes, macrophages, NK...).

L'analyse de co-expression network a permis de définir 6 modules enrichis en gènes immuns: les cellules NK et l'immunité innée, les cytokines et les molécules de complexe d'histocompatibilité, la signalisation cellulaire et les lectines, l'activation cellulaire et l'apoptose, les cellules myéloïdes et la régulation de la réponse immune. Cette signature confirme l'impact du microenvironnement notamment des cellules immunes dans le GBM. Diverses signatures ont été publiées dans la littérature, mais elles impliquent souvent différents types cellulaires et elles n'ont pas forcément de lien ou d'impact sur la survie et/ou sur la réponse aux traitements.

Nous avons ensuite recherché plus spécifiquement une signature immunologique pronostique ayant un impact sur la survie afin de coupler notre analyse biologique à une approche plus clinique.

Pour cela, nous avons analysé les interactions entre les gènes de l'analyse de co-expression et la survie globale, en étudiant les modules enrichis en gènes associés à la survie des patients. Seuls 2 modules sont significativement enrichis : cellules NK et immunité innée, cytokines et molécules de complexe d'histocompatibilité.

Nous avons également étudié l'ensemble des gènes immuns vis-à-vis d'un possible impact sur la survie par différentes méthodes statistiques avant d'établir un modèle de risque mathématique pronostique vis-à-vis de la survie globale. Cent huit gènes immuns sont associés à une différence de survie des GBM. Ils correspondent soit à des gènes impliqués dans la biologie des différentes cellules immunes B, T, NK, monocytes/macrophages et neutrophiles, soit à des gènes de cytokines et chimiokines, soit à des gènes impliqués dans l'immunomodulation.

Un modèle de risque robuste à 6 gènes a pu être établi et validé sur plusieurs jeux de données avec différentes technologies, pour distinguer de manière reproductible sur différentes séries, deux populations de pronostic différent, y compris pour les tumeurs ayant un promoteur de *MGMT* méthylé et pour le sous-groupe de GBM proneuraux. Nous avons donc pu mettre en évidence une signature immune pronostique dans le GBM.

Cette étude souligne que le système immunitaire peut intervenir dans le pronostic du GBM, même chez les patients qui ont un meilleur pronostic. Cela met en valeur le rôle du système immunitaire pour combattre la tumeur et encourage le développement de nouvelles stratégies d'immunothérapie pour traiter les patients ayant un GBM.

La signature cellulaire a été validée *in vivo* en étudiant l'infiltration des cellules immunes dans des échantillons tumoraux issus de GBM.

La signature immune n'est pas altérée par la congélation. L'infiltration leucocytaire est principalement présente dans la zone tumorale. La zone péri tumorale semble peu infiltrée par des cellules immunes. De même, aucune infiltration leucocytaire n'est retrouvée au niveau du tissu cérébral sain issu de cortectomie pour l'épilepsie.

La population cellulaire infiltrante est variée, mais elle est toujours constituée au minimum par des cellules macrophagiques, microgliales.

L'infiltration lymphocytaire correspond rarement à des lymphocytes B ou des cellules NK, il s'agit principalement de lymphocytes T dans notre étude et très rarement des LTreg.

Dans quelques cas, nous retrouvons une infiltration en cellules ayant un phénotype de polynucléaires granuleux.

Ni la corticothérapie administrée avant le geste chirurgical, ni l'âge des patients ne semblent avoir d'impact sur cette infiltration cellulaire.

Seule l'infiltration de lymphocytes est corrélée à la survie, une infiltration lymphocytaire étant de meilleur pronostic.

5. PERSPECTIVES

Dans cette étude, nous avons recherché un lien entre la survie des patients et l'infiltration en leucocytes, cellules microgliales/macrophagiques, lymphocytes et cellules de type granulocytaire. Nous prévoyons également d'individualiser ces sous-populations suivant l'expression des différents marqueurs étudiés, par exemple CD163 ou CD16 pour les cellules myéloïdes, afin d'analyser un éventuel impact de ces sous-populations sur la survie.

Dans la population que nous avons étudiée, ainsi que dans les études rapportées dans la littérature, les patients ne sont pas tous traités de manière identique, ce qui entraîne inévitablement un biais. De plus, il est important, pour interpréter des données de survie de tenir compte des éléments ayant un impact pronostique ou prédictif de réponse au traitement, à savoir l'âge, le KPS, le type de résection et le statut MGMT. Nous prévoyons donc maintenant de rechercher l'infiltration leucocytaire par IHC dans une cohorte rétrospective de patients traités par le traitement standard et pour lesquels nous disposons du suivi et de ces facteurs influençant la survie. L'infiltration en cellules immunes des patients présentant un statut MGMT de type « répondeur au TMZ » sera particulièrement intéressante à analyser ; ces patients vivant plus longtemps et étant susceptibles de développer une réaction immunitaire. En parallèle, la cytométrie en flux permettant d'étudier des sous-populations non accessibles actuellement pas analyse en IHC, nous continuerons à congeler les tumeurs dans des conditions permettant ce type d'analyse, afin d'avoir une cohorte importante de patients permettant également des analyses de survie sur des populations plus homogènes. D'autre part, nous envisageons également différents tests fonctionnels afin de mieux caractériser ces contingents cellulaires, afin notamment d'étudier leurs actions vis à vis des cellules tumorales. L'analyse de l'environnement immunitaire des GBM permettra probablement de comprendre les limites et les perspectives de l'immunothérapie. En effet, cette approche thérapeutique n'a

pas permis d'obtenir un bénéfice clinique majeur jusqu'à présent (193). Mais la connaissance de la population immune majoritaire, des propriétés immunomodulatrices de ces cellules pourraient améliorer la définition des cibles potentielles de l'immunothérapie.

Il serait enfin intéressant de tester l'intérêt de ce modèle de risque à 6 gènes et de faire une comparaison globale avec les données du méthylome, transcriptome (classification de Verhaak...) et de différentes signatures comme celle à 4 gènes publiée par Marie de Tayrac de notre laboratoire.

6. BIBLIOGRAPHIE

- (1) De Angelis LM. Brain tumors. *N Engl J Med* 2001; 344(2):114-123.
- (2) Fisher JL, Schwartzbaum JA, Wrensch M, Wiemels JL. Epidemiology of brain tumors. *Neurol Clin* 2007; 25(4):867-890.
- (3) Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW et al. The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002; 61(3):215-225.
- (4) Rigau V, Zouaoui S, Mathieu-Daude H et al. French brain tumor database: 5-year histological results on 25 756 cases. *Brain Pathol* 2011; 21(6):633-644.
- (5) Ahsan H, Neugut AI, Bruce JN. Trends in incidence of primary malignant brain tumors in USA, 1981-1990. *Int J Epidemiol* 1995; 24(6):1078-1085.
- (6) Fleury A, Menegoz F, Grosclaude P et al. Descriptive epidemiology of cerebral gliomas in France. *Cancer* 1997; 79(6):1195-1202.
- (7) Zouaoui S, Rigau V, Mathieu-Daude H et al. [French brain tumor database: general results on 40,000 cases, main current applications and future prospects]. *Neurochirurgie* 2012; 58(1):4-13.
- (8) Baldi I, Huchet A, Bauchet L, Loiseau H. [Epidemiology of glioblastoma]. *Neurochirurgie* 2010; 56(6):433-440.
- (9) Davies FG, Preston-Martin S. Epidemiology. Incidence and survival. In: McLendon RE, Bigner DD, Bruner JM, editors. *Russell & Rubinstein's Pathology of Tumors of the Nervous System* 6 Ed. Vol.1. London: Arnold, 1998: 5-45.
- (10) Becker KP, Yu J. Status quo--standard-of-care medical and radiation therapy for glioblastoma. *Cancer J* 2012; 18(1):12-19.
- (11) Kleihues P, Ohgaki H. Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro Oncol* 1999; 1(1):44-51.
- (12) Paquis P, Menei P. [Introduction: glioblastomas]. *Neurochirurgie* 2010; 56(6):431-432.
- (13) Purow B, Schiff D. Advances in the genetics of glioblastoma: are we reaching critical mass? *Nat Rev Neurol* 2009; 5(8):419-426.
- (14) Ohgaki H, Kleihues P. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol* 2005; 109(1):93-108.
- (15) Ron E, Modan B, Boice JD, Jr. et al. Tumors of the brain and nervous system after radiotherapy in childhood. *N Engl J Med* 1988; 319(16):1033-1039.
- (16) Soffer D, Gomori JM, Pomeranz S, Siegal T. Gliomas following low-dose irradiation to the head report of three cases. *J Neurooncol* 1990; 8(1):67-72.

- (17) Neglia JP, Meadows AT, Robison LL et al. Second neoplasms after acute lymphoblastic leukemia in childhood. *N Engl J Med* 1991; 325(19):1330-1336.
- (18) Relling MV, Rubnitz JE, Rivera GK et al. High incidence of secondary brain tumours after radiotherapy and antimetabolites. *Lancet* 1999; 354(9172):34-39.
- (19) Walter AW, Hancock ML, Pui CH et al. Secondary brain tumors in children treated for acute lymphoblastic leukemia at St Jude Children's Research Hospital. *J Clin Oncol* 1998; 16(12):3761-3767.
- (20) Huncharek M, Kupelnick B, Wheeler L. Dietary cured meat and the risk of adult glioma: a meta-analysis of nine observational studies. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2003; 22(2):129-137.
- (21) Ruder AM, Carreon T, Butler MA et al. Exposure to farm crops, livestock, and farm tasks and risk of glioma: the Upper Midwest Health Study. *Am J Epidemiol* 2009; 169(12):1479-1491.
- (22) Samanic CM, De Roos AJ, Stewart PA, Rajaraman P, Waters MA, Inskip PD. Occupational exposure to pesticides and risk of adult brain tumors. *Am J Epidemiol* 2008; 167(8):976-985.
- (23) Shim YK, Mlynarek SP, van WE. Parental exposure to pesticides and childhood brain cancer: U.S. Atlantic coast childhood brain cancer study. *Environ Health Perspect* 2009; 117(6):1002-1006.
- (24) Savitz DA, Loomis DP. Magnetic field exposure in relation to leukemia and brain cancer mortality among electric utility workers. *Am J Epidemiol* 1995; 141(2):123-134.
- (25) Theriault G, Goldberg M, Miller AB et al. Cancer risks associated with occupational exposure to magnetic fields among electric utility workers in Ontario and Quebec, Canada, and France: 1970-1989. *Am J Epidemiol* 1994; 139(6):550-572.
- (26) Villeneuve PJ, Agnew DA, Johnson KC, Mao Y. Brain cancer and occupational exposure to magnetic fields among men: results from a Canadian population-based case-control study. *Int J Epidemiol* 2002; 31(1):210-217.
- (27) Frumkin H, Jacobson A, Gansler T, Thun MJ. Cellular phones and risk of brain tumors. *CA Cancer J Clin* 2001; 51(2):137-141.
- (28) Hardell L, Mild KH, Carlberg M. Case-control study on the use of cellular and cordless phones and the risk for malignant brain tumours. *Int J Radiat Biol* 2002; 78(10):931-936.
- (29) Johansen C, Boice J, Jr., McLaughlin J, Olsen J. Cellular telephones and cancer--a nationwide cohort study in Denmark. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93(3):203-207.
- (30) Muscat JE, Malkin MG, Thompson S et al. Handheld cellular telephone use and risk of brain cancer. *JAMA* 2000; 284(23):3001-3007.

- (31) Repacholi MH, Lerchl A, Roosli M et al. Systematic review of wireless phone use and brain cancer and other head tumors. *Bioelectromagnetics* 2012; 33(3):187-206.
- (32) Cowppli-Bony A, Bouvier G, Rue M et al. Brain tumors and hormonal factors: review of the epidemiological literature. *Cancer Causes Control* 2011; 22(5):697-714.
- (33) Lehrer S. Cytomegalovirus infection in early childhood may be protective against glioblastoma multiforme, while later infection is a risk factor. *Med Hypotheses* 2012; 78(5):657-658.
- (34) Lehrer S, Green S, Ramanathan L, Rosenzweig K, Labombardi V. No consistent relationship of glioblastoma incidence and cytomegalovirus seropositivity in whites, blacks, and Hispanics. *Anticancer Res* 2012; 32(3):1113-1115.
- (35) Cobbs CS, Harkins L, Samanta M et al. Human cytomegalovirus infection and expression in human malignant glioma. *Cancer Res* 2002; 62(12):3347-3350.
- (36) Mitchell DA, Xie W, Schmittling R et al. Sensitive detection of human cytomegalovirus in tumors and peripheral blood of patients diagnosed with glioblastoma. *Neuro Oncol* 2008; 10(1):10-18.
- (37) Ghazi A, Ashoori A, Hanley PJ et al. Generation of polyclonal CMV-specific T cells for the adoptive immunotherapy of glioblastoma. *J Immunother* 2012; 35(2):159-168.
- (38) Prins RM, Cloughesy TF, Liao LM. Cytomegalovirus immunity after vaccination with autologous glioblastoma lysate. *N Engl J Med* 2008; 359(5):539-541.
- (39) Dziurzynski K, Chang SM, Heimberger AB et al. Consensus on the role of human cytomegalovirus in glioblastoma. *Neuro Oncol* 2012; 14(3):246-255.
- (40) Sampson JH, Mitchell DA. Is cytomegalovirus a therapeutic target in glioblastoma? *Clin Cancer Res* 2011; 17(14):4619-4621.
- (41) Soderberg Naucler C, Stragliotto G, Peredo I et al. Effects of valgancyclovir as an add-on-therapy in patients with cytomegalovirus-positive glioblastoma: a randomised, double-blind, proof-of-concept study. *Neuro Oncol* 2012; 14(Supp.3):Abst. P.139.
- (42) Stragliotto G, Bartek J, Hylin S, Peredo I, Rahbar A, Soderberg Naucler C. Is there a role for anti-CMV therapy in Glioblastoma? The tale of valganciclovir as add-on to standard surgery and radiochemotherapy. *Neuro Oncol* 2012; 14(Supp.3):Abst. P.142.
- (43) Lehrer S, Labombardi V, Green S, Pessin-Minsley MS, Germano IM, Rosenzweig KE. No circulating cytomegalovirus in five patients with glioblastoma multiforme. *Anticancer Res* 2011; 31(3):959-960.
- (44) Del Valle L, Gordon J, Assimakopoulou M et al. Detection of JC virus DNA sequences and expression of the viral regulatory protein T-antigen in tumors of the central nervous system. *Cancer Res* 2001; 61(10):4287-4293.

- (45) Shah KV. SV40 and human cancer: a review of recent data. *Int J Cancer* 2007; 120(2):215-223.
- (46) Vilchez RA, Kozinetz CA, Arrington AS, Madden CR, Butel JS. Simian virus 40 in human cancers. *Am J Med* 2003; 114(8):675-684.
- (47) Wrensch M, Weinberg A, Wiencke J et al. Does prior infection with varicella-zoster virus influence risk of adult glioma? *Am J Epidemiol* 1997; 145(7):594-597.
- (48) Brenner AV, Linet MS, Fine HA et al. History of allergies and autoimmune diseases and risk of brain tumors in adults. *Int J Cancer* 2002; 99(2):252-259.
- (49) Lachance DH, Yang P, Johnson DR et al. Associations of high-grade glioma with glioma risk alleles and histories of allergy and smoking. *Am J Epidemiol* 2011; 174(5):574-581.
- (50) Linos E, Raine T, Alonso A, Michaud D. Atopy and risk of brain tumors: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99(20):1544-1550.
- (51) Schlehofer B, Blettner M, Preston-Martin S et al. Role of medical history in brain tumour development. Results from the international adult brain tumour study. *Int J Cancer* 1999; 82(2):155-160.
- (52) Schwartzbaum J, Jonsson F, Ahlbom A et al. Cohort studies of association between self-reported allergic conditions, immune-related diagnoses and glioma and meningioma risk. *Int J Cancer* 2003; 106(3):423-428.
- (53) Wiemels JL, Wiencke JK, Sison JD, Miike R, McMillan A, Wrensch M. History of allergies among adults with glioma and controls. *Int J Cancer* 2002; 98(4):609-615.
- (54) Zhou M, Wiemels JL, Bracci PM et al. Circulating levels of the innate and humoral immune regulators CD14 and CD23 are associated with adult glioma. *Cancer Res* 2010; 70(19):7534-7542.
- (55) Bahuau M, Vidaud D, Jenkins RB et al. Germ-line deletion involving the INK4 locus in familial proneness to melanoma and nervous system tumors. *Cancer Res* 1998; 58(11):2298-2303.
- (56) Sharpless NE, Bardeesy N, Lee KH et al. Loss of p16Ink4a with retention of p19Arf predisposes mice to tumorigenesis. *Nature* 2001; 413(6851):86-91.
- (57) Wrensch M, Wiencke JK, Wiemels J et al. Serum IgE, tumor epidermal growth factor receptor expression, and inherited polymorphisms associated with glioma survival. *Cancer Res* 2006; 66(8):4531-4541.
- (58) Rey Norez JE, Bensussan A, Vita N et al. Soluble CD14 acts as a negative regulator of human T cell activation and function. *Eur J Immunol* 1999; 29(1):265-276.
- (59) Lachaux A, Kaiserlian D. [CD23: structures, functions and practical perspectives in allergy reactions]. *Pediatric* 1993; 48(4):305-312.

- (60) Pallud J, Mandonnet E, Duffau H et al. Prognostic value of initial magnetic resonance imaging growth rates for World Health Organization grade II gliomas. *Ann Neurol* 2006; 60(3):380-383.
- (61) Grand S, Ternier J, Rousseau N et al. [Cerebral abscess: MRI, DWI and MRS features]. *J Neuroradiol* 2004; 31(2):145-147.
- (62) Wirtz CR, Albert FK, Schwaderer M et al. The benefit of neuronavigation for neurosurgery analyzed by its impact on glioblastoma surgery. *Neurol Res* 2000; 22(4):354-360.
- (63) Daumas-Duport C, Scheithauer BW, Kelly PJ. A histologic and cytologic method for the spatial definition of gliomas. *Mayo Clin Proc* 1987; 62(6):435-449.
- (64) Mason WP, Maestro RD, Eisenstat D et al. Canadian recommendations for the treatment of glioblastoma multiforme. *Curr Oncol* 2007; 14(3):110-117.
- (65) Wood JR, Green SB, Shapiro WR. The prognostic importance of tumor size in malignant gliomas: a computed tomographic scan study by the Brain Tumor Cooperative Group. *J Clin Oncol* 1988; 6(2):338-343.
- (66) Fink J, Born D, Chamberlain MC. Pseudoprogression: relevance with respect to treatment of high-grade gliomas. *Curr Treat Options Oncol* 2011; 12(3):240-252.
- (67) Macdonald DR, Cascino TL, Schold SC, Jr., Cairncross JG. Response criteria for phase II studies of supratentorial malignant glioma. *J Clin Oncol* 1990; 8(7):1277-1280.
- (68) Wen PY, Macdonald DR, Reardon DA et al. Updated response assessment criteria for high-grade gliomas: response assessment in neuro-oncology working group. *J Clin Oncol* 2010; 28(11):1963-1972.
- (69) La Fougere C, Suchorska B, Bartenstein P, Kreth FW, Tonn JC. Molecular imaging of gliomas with PET: opportunities and limitations. *Neuro Oncol* 2011; 13(8):806-819.
- (70) Terakawa Y, Tsuyuguchi N, Iwai Y et al. Diagnostic accuracy of ¹¹C-methionine PET for differentiation of recurrent brain tumors from radiation necrosis after radiotherapy. *J Nucl Med* 2008; 49(5):694-699.
- (71) De Clermont H, Huchet A, Lamare F, Riviere A, Fernandez P. Lack of concordance between the F-18 fluoromisonidazole PET and the F-18 FDG PET in human glioblastoma. *Clin Nucl Med* 2011; 36(12):e194-e195.
- (72) Kunz M, Thon N, Eigenbrod S et al. Hot spots in dynamic (18)FET-PET delineate malignant tumor parts within suspected WHO grade II gliomas. *Neuro Oncol* 2011; 13(3):307-316.
- (73) Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 2007; 114(2):97-109.

- (74) Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; 352(10):987-996.
- (75) Koshy M, Villano JL, Dolecek TA et al. Improved survival time trends for glioblastoma using the SEER 17 population-based registries. *J.Clin.Oncol.*, 2011 ASCO Annual Meeting Proceedings 29[15 Suppl.], abstract 2013. 2011.
Ref Type: Magazine Article
- (76) Lwin Z, MacFadden D, Al-Zahrani A et al. A population-based study of glioblastoma multiforme (GBM) in the new stupp paradigm: Have we improved outcome? *J.Clin.Oncol.*, 2011 ASCO Annual Meeting Proceedings 29[15 Suppl.], abstr.2012. 2011.
Ref Type: Magazine Article
- (77) Preusser M, Woehrer A, Zielonke N et al. Real-life survival in unselected adult glioblastoma patients: A population-based study. *J.Clin.Oncol.*, 2011 ASCO Annual Meeting Proceedings 29[15 Suppl.], abstract 2014. 2011.
Ref Type: Magazine Article
- (78) Noel G, Guillevin R. [Delineation of glioblastoma, simplicity to complexity, the contribution of imaging]. *Cancer Radiother* 2011; 15(6-7):484-494.
- (79) Emami B, Lyman J, Brown A et al. Tolerance of normal tissue to therapeutic irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1991; 21(1):109-122.
- (80) Haberer S, Assouline A, Mazeron JJ. [Normal tissue tolerance to external beam radiation therapy: brain and hypophysis]. *Cancer Radiother* 2010; 14(4-5):263-268.
- (81) Lawrence YR, Li XA, el N, I et al. Radiation dose-volume effects in the brain. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2010; 76(3 Suppl):S20-S27.
- (82) Roldan Urgoiti GB, Singh AD, Easaw JC. Extended adjuvant temozolomide for treatment of newly diagnosed glioblastoma multiforme. *J Neurooncol* 2012; 108(1):173-177.
- (83) Chauffert B, Feuvret L, Bonnetain F et al. Randomised Multicenter Phase II trial of irinotecan and bevacizumab as neo-adjuvant and adjuvant to temozolomide-based chemoradiation versus chemoradiation for unresectable glioblastoma (definitive results of the Temavir ANOCEF Study). *Abst. LBA15. Ann Oncol* 2012; 23(Suppl.9):ixe7.
- (84) Hatanpaa KJ, Burma S, Zhao D, Habib AA. Epidermal growth factor receptor in glioma: signal transduction, neuropathology, imaging, and radioresistance. *Neoplasia* 2010; 12(9):675-684.
- (85) Ayuso-Sacido A, Moliterno JA, Kratovac S et al. Activated EGFR signaling increases proliferation, survival, and migration and blocks neuronal differentiation in post-natal neural stem cells. *J Neurooncol* 2010; 97(3):323-337.
- (86) Sampson JH, Heimberger AB, Archer GE et al. Immunologic escape after prolonged progression-free survival with epidermal growth factor receptor variant III peptide

vaccination in patients with newly diagnosed glioblastoma. *J Clin Oncol* 2010; 28(31):4722-4729.

- (87) Roa W, Brasher PM, Bauman G et al. Abbreviated course of radiation therapy in older patients with glioblastoma multiforme: a prospective randomized clinical trial. *J Clin Oncol* 2004; 22(9):1583-1588.
- (88) Keime-Guibert F, Chinot O, Taillandier L et al. Radiotherapy for glioblastoma in the elderly. *N Engl J Med* 2007; 356(15):1527-1535.
- (89) Gallego Perez-Larraya J, Ducray F, Chinot O et al. Temozolomide in elderly patients with newly diagnosed glioblastoma and poor performance status: an ANOCEF phase II trial. *J Clin Oncol* 2011; 29(22):3050-3055.
- (90) Malmstrom A, Gronberg BH, Marosi C et al. Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2012; 13(9):916-926.
- (91) Wick W, Platten M, Meisner C et al. Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: the NOA-08 randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2012; 13(7):707-715.
- (92) Stupp R, Hegi ME, Mason WP et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol* 2009; 10(5):459-466.
- (93) Curran WJ, Jr., Scott CB, Horton J et al. Recursive partitioning analysis of prognostic factors in three Radiation Therapy Oncology Group malignant glioma trials. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85(9):704-710.
- (94) Mirimanoff RO, Gorlia T, Mason W et al. Radiotherapy and temozolomide for newly diagnosed glioblastoma: recursive partitioning analysis of the EORTC 26981/22981-NCIC CE3 phase III randomized trial. *J Clin Oncol* 2006; 24(16):2563-2569.
- (95) Li J, Wang M, Won M et al. Validation and simplification of the Radiation Therapy Oncology Group recursive partitioning analysis classification for glioblastoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2011; 81(3):623-630.
- (96) Ohgaki H, Dessen P, Jourde B et al. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res* 2004; 64(19):6892-6899.
- (97) Bao S, Wu Q, McLendon RE et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 2006; 444(7120):756-760.
- (98) Eramo A, Ricci-Vitiani L, Zeuner A et al. Chemotherapy resistance of glioblastoma stem cells. *Cell Death Differ* 2006; 13(7):1238-1241.
- (99) Dirks PB. Cancer: stem cells and brain tumours. *Nature* 2006; 444(7120):687-688.

- (100) Galli R, Binda E, Orfanelli U et al. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res* 2004; 64(19):7011-7021.
- (101) Singh SK, Clarke ID, Terasaki M et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 2003; 63(18):5821-5828.
- (102) Singh SK, Hawkins C, Clarke ID et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004; 432(7015):396-401.
- (103) Lonjon N, Bauchet L, Duffau H et al. [Second surgery for glioblastoma. A 4-year retrospective study conducted in both the Montpellier and Nice Departments of Neurosurgery. A literature review]. *Neurochirurgie* 2010; 56(1):36-42.
- (104) Westphal M, Hilt DC, Bortey E et al. A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma. *Neuro Oncol* 2003; 5(2):79-88.
- (105) Westphal M, Ram Z, Riddle V, Hilt D, Bortey E. Gliadel wafer in initial surgery for malignant glioma: long-term follow-up of a multicenter controlled trial. *Acta Neurochir (Wien)* 2006; 148(3):269-275.
- (106) McGirt MJ, Than KD, Weingart JD et al. Gliadel (BCNU) wafer plus concomitant temozolomide therapy after primary resection of glioblastoma multiforme. *J Neurosurg* 2009; 110(3):583-588.
- (107) Rich JN, Bao S. Chemotherapy and cancer stem cells. *Cell Stem Cell* 2007; 1(4):353-355.
- (108) Noel G, Schott R, Froelich S et al. Retrospective Comparison of Chemoradiotherapy Followed by Adjuvant Chemotherapy, With or Without Prior Gliadel Implantation (Carmustine) After Initial Surgery in Patients With Newly Diagnosed High-Grade Gliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2011; 82(2):749-755.
- (109) Brem H, Ewend MG, Piantadosi S, Greenhoot J, Burger PC, Sisti M. The safety of interstitial chemotherapy with BCNU-loaded polymer followed by radiation therapy in the treatment of newly diagnosed malignant gliomas: phase I trial. *J Neurooncol* 1995; 26(2):111-123.
- (110) Bock HC, Puchner MJ, Lohmann F et al. First-line treatment of malignant glioma with carmustine implants followed by concomitant radiochemotherapy: a multicenter experience. *Neurosurg Rev* 2010; 33(4):441-449.
- (111) Hart MG, Grant R, Garside R, Rogers G, Somerville M, Stein K. Chemotherapy wafers for high grade glioma. *Cochrane Database Syst Rev* 2011; 3:CD007294.
- (112) Combs SE, Gutwein S, Thilmann C, Debus J, Schulz-Ertner D. Reirradiation of recurrent WHO grade III astrocytomas using fractionated stereotactic radiotherapy (FSRT). *Strahlenther Onkol* 2005; 181(12):768-773.

- (113) Fogh S, Machtay M, Werner-Wasik M et al. Phase I trial using patupilone (epothilone B) and concurrent radiotherapy for central nervous system malignancies. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2010; 77(4):1009-1016.
- (114) Noel G, Ben Ammar CN, Feuvret L et al. [Results of salvage stereotactic radiosurgery in 14 patients with grade III or IV gliomas]. *Rev Neurol (Paris)* 2004; 160(5 Pt 1):539-545.
- (115) Patel M, Siddiqui F, Jin JY et al. Salvage reirradiation for recurrent glioblastoma with radiosurgery: radiographic response and improved survival. *J Neurooncol* 2009; 92(2):185-191.
- (116) Wong ET, Hess KR, Gleason MJ et al. Outcomes and prognostic factors in recurrent glioma patients enrolled onto phase II clinical trials. *J Clin Oncol* 1999; 17(8):2572-2578.
- (117) Perry JR, Belanger K, Mason WP et al. Phase II trial of continuous dose-intense temozolomide in recurrent malignant glioma: RESCUE study. *J Clin Oncol* 2010; 28(12):2051-2057.
- (118) Wick A, Felsberg J, Steinbach JP et al. Efficacy and tolerability of temozolomide in an alternating weekly regimen in patients with recurrent glioma. *J Clin Oncol* 2007; 25(22):3357-3361.
- (119) Neyns B, Chaskis C, Joosens E et al. A multicenter cohort study of dose-dense temozolomide (21 of 28 days) for the treatment of recurrent anaplastic astrocytoma or oligoastrocytoma. *Cancer Invest* 2008; 26(3):269-277.
- (120) Easaw JC, Mason WP, Perry J et al. Canadian recommendations for the treatment of recurrent or progressive glioblastoma multiforme. *Curr Oncol* 2011; 18(3):e126-e136.
- (121) Gilbert M, Wang M, Aldape KD et al. RTOG 0525: A randomized phase III trial comparing standard adjuvant temozolomide (TMZ) with a dose-dense (dd) schedule in newly diagnosed glioblastoma (GBM). *J Clin Oncol* , 2011 ASCO Annual Meeting Proceedings 2011; 29(15 Supp.):abst. 2006.
- (122) Jensen RL, Ragel BT, Whang K, Gillespie D. Inhibition of hypoxia inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) decreases vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion and tumor growth in malignant gliomas. *J Neurooncol* 2006; 78(3):233-247.
- (123) Plate KH, Breier G, Weich HA, Risau W. Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature* 1992; 359(6398):845-848.
- (124) Vredenburgh JJ, Desjardins A, Herndon JE et al. Bevacizumab plus irinotecan in recurrent glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol* 2007; 25(30):4722-4729.
- (125) Wong ET, Gautam S, Malchow C, Lun M, Pan E, Brem S. Bevacizumab for recurrent glioblastoma multiforme: a meta-analysis. *J Natl Compr Canc Netw* 2011; 9(4):403-407.

- (126) Friedman HS, Prados MD, Wen PY et al. Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol* 2009; 27(28):4733-4740.
- (127) Grudé F, Campone M, Frenel J et al. Bevacizumab and irinotecan in patients with recurrent glioblastoma (GBM): Results of a retrospective cohort study of the OMIT Bretagne and Pays de la Loire. *J Clin Oncol* 2011; 29(Suppl.):abstract 2086.
- (128) Grudé F, Campone M, Frenel J et al. Intérêt de l'association bevacizumab-irinotécan dans les glioblastomes récidivants : résultats d'une cohorte rétrospective de 202 patients OMIT Bretagne/Pays de Loire. RC6. Anocéf, Deauville 17-18 juin 2011. 2011.
- (129) Vauleon E, Mesbah H, Gedouin D et al. [Retrospective analysis of 24 recurrent glioblastoma after chemoradiation and treated with nitrosoureas or irinotecan and bevacizumab]. *Bull Cancer* 2012; 99(2):121-126.
- (130) de Groot JF, Fuller G, Kumar AJ et al. Tumor invasion after treatment of glioblastoma with bevacizumab: radiographic and pathologic correlation in humans and mice. *Neuro Oncol* 2010; 12(3):233-242.
- (131) Iwamoto FM, Abrey LE, Beal K et al. Patterns of relapse and prognosis after bevacizumab failure in recurrent glioblastoma. *Neurology* 2009; 73(15):1200-1206.
- (132) Norden AD, Young GS, Setayesh K et al. Bevacizumab for recurrent malignant gliomas: efficacy, toxicity, and patterns of recurrence. *Neurology* 2008; 70(10):779-787.
- (133) Wick W, Wick A, Weiler M, Weller M. Patterns of progression in malignant glioma following anti-VEGF therapy: perceptions and evidence. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2011; 11(3):305-312.
- (134) Kong DS, Song SY, Kim DH et al. Prognostic significance of c-Met expression in glioblastomas. *Cancer* 2009; 115(1):140-148.
- (135) Michaud NR, Jani JP, Hillerman S et al. Biochemical and pharmacological characterization of human c-Met neutralizing monoclonal antibody CE-355621. *MAbs* 2012; 4(6).
- (136) Batchelor TT, Duda DG, di TE et al. Phase II study of cediranib, an oral pan-vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol* 2010; 28(17):2817-2823.
- (137) Brandes AA, Stupp R, Hau P et al. EORTC study 26041-22041: phase I/II study on concomitant and adjuvant temozolomide (TMZ) and radiotherapy (RT) with PTK787/ZK222584 (PTK/ZK) in newly diagnosed glioblastoma. *Eur J Cancer* 2010; 46(2):348-354.
- (138) de Groot JF, Lamborn KR, Chang SM et al. Phase II study of aflibercept in recurrent malignant glioma: a North American Brain Tumor Consortium study. *J Clin Oncol* 2011; 29(19):2689-2695.

- (139) Holash J, Davis S, Papadopoulos N et al. VEGF-Trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(17):11393-11398.
- (140) Iwamoto FM, Lamborn KR, Robins HI et al. Phase II trial of pazopanib (GW786034), an oral multi-targeted angiogenesis inhibitor, for adults with recurrent glioblastoma (North American Brain Tumor Consortium Study 06-02). *Neuro Oncol* 2010; 12(8):855-861.
- (141) Pan E, Yu D, Yue B et al. A prospective phase II single-institution trial of sunitinib for recurrent malignant glioma. *J Neurooncol* 2012; 110(1):111-118.
- (142) A phase 2 trial of the multitargeted kinase inhibitor lenvatinib (E7080) in patients (pts) with recurrent glioblastoma (GBM) and disease progression following prior bevacizumab treatment. Poster 417PD.: 2012.
- (143) Reardon DA, Vredenburgh JJ, Desjardins A et al. Effect of CYP3A-inducing anti-epileptics on sorafenib exposure: results of a phase II study of sorafenib plus daily temozolomide in adults with recurrent glioblastoma. *J Neurooncol* 2011; 101(1):57-66.
- (144) Batchelor TT, Mulholland P, Neyns B et al. The efficacy of Cediranib as monotherapy and in combination with Lomustine compared to lomustine alone in patients with recurrent glioblastoma. OT-25. *Neuro Oncol* 2010; 12(Suppl.4):iv75.
- (145) Goldlust SA, Cavaliere R, Newton HB et al. Bevacizumab for glioblastoma refractory to vascular endothelial growth factor receptor inhibitors. *J Neurooncol* 2012; 107(2):407-411.
- (146) Scott BJ, Quant EC, McNamara MB, Ryg PA, Batchelor TT, Wen PY. Bevacizumab salvage therapy following progression in high-grade glioma patients treated with VEGF receptor tyrosine kinase inhibitors. *Neuro Oncol* 2010; 12(6):603-607.
- (147) Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 2010; 17(1):98-110.
- (148) Fujisawa H, Reis RM, Nakamura M et al. Loss of heterozygosity on chromosome 10 is more extensive in primary (de novo) than in secondary glioblastomas. *Lab Invest* 2000; 80(1):65-72.
- (149) He J, Mokhtari K, Sanson M et al. Glioblastomas with an oligodendroglial component: a pathological and molecular study. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001; 60(9):863-871.
- (150) Sanson M, Marie Y, Huguet S, He J, Hoang-Xuan K. [Genes implicated in glial tumors]. *Morphologie* 2000; 84(265):51-55.
- (151) Kanno H, Nishihara H, Narita T et al. Prognostic implication of histological oligodendroglial tumor component: clinicopathological analysis of 111 cases of malignant gliomas. *PLoS One* 2012; 7(7):e41669.

- (152) Balss J, Meyer J, Mueller W, Korshunov A, Hartmann C, von DA. Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathol* 2008; 116(6):597-602.
- (153) Parsons DW, Jones S, Zhang X et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 2008; 321(5897):1807-1812.
- (154) Capper D, Zentgraf H, Balss J, Hartmann C, von DA. Monoclonal antibody specific for IDH1 R132H mutation. *Acta Neuropathol* 2009; 118(5):599-601.
- (155) Frenel J, Leux C, Loussouarn D et al. Predictive value of IDH1 mutation assessed by immunohistochemistry and DNA sequencing in. *J Clin Oncol* , 2011 ASCO Annual Meeting Proceedings 2011; 29(15 Supp.):abstr 2002.
- (156) Frezza C, Tennant DA, Gottlieb E. IDH1 mutations in gliomas: when an enzyme loses its grip. *Cancer Cell* 2010; 17(1):7-9.
- (157) Zhao S, Lin Y, Xu W et al. Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1alpha. *Science* 2009; 324(5924):261-265.
- (158) Jin G, Reitman ZJ, Spasojevic I et al. 2-hydroxyglutarate production, but not dominant negative function, is conferred by glioma-derived NADP-dependent isocitrate dehydrogenase mutations. *PLoS One* 2011; 6(2):e16812.
- (159) Lu C, Ward PS, Kapoor GS et al. IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature* 2012; 483(7390):474-478.
- (160) Duncan CG, Barwick BG, Jin G et al. A heterozygous IDH1R132H/WT mutation induces genome-wide alterations in DNA methylation. *Genome Res* 2012; 22(12):2339-2355.
- (161) Rao MS. Stem sense: a proposal for the classification of stem cells. *Stem Cells Dev* 2004; 13(5):452-455.
- (162) Vescovi AL, Galli R, Reynolds BA. Brain tumour stem cells. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(6):425-436.
- (163) Ohgaki H. Epidemiology of brain tumors. *Methods Mol Biol* 2009; 472:323-342.
- (164) Phillips HS, Kharbanda S, Chen R et al. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* 2006; 9(3):157-173.
- (165) Lee Y, Scheck AC, Cloughesy TF et al. Gene expression analysis of glioblastomas identifies the major molecular basis for the prognostic benefit of younger age. *BMC Med Genomics* 2008; 1:52.
- (166) Gravendeel LA, Kouwenhoven MC, Gevaert O et al. Intrinsic gene expression profiles of gliomas are a better predictor of survival than histology. *Cancer Res* 2009; 69(23):9065-9072.

- (167) Nutt CL, Mani DR, Betensky RA et al. Gene expression-based classification of malignant gliomas correlates better with survival than histological classification. *Cancer Res* 2003; 63(7):1602-1607.
- (168) Rickman DS, Bobek MP, Misek DE et al. Distinctive molecular profiles of high-grade and low-grade gliomas based on oligonucleotide microarray analysis. *Cancer Res* 2001; 61(18):6885-6891.
- (169) De Tayrac M, Aubry M, Saikali S et al. A 4-gene signature associated with clinical outcome in high-grade gliomas. *Clin Cancer Res* 2011; 17(2):317-327.
- (170) Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; 352(10):997-1003.
- (171) Quillien V, Vauleon E, Saikali S et al. [MGMT analysis in gliomas]. *Bull Cancer* 2011; 98(3):291-303.
- (172) Quillien V, Lavenu A, Karayan-Tapon L et al. Comparative assessment of 5 methods (methylation-specific polymerase chain reaction, MethyLight, pyrosequencing, methylation-sensitive high-resolution melting, and immunohistochemistry) to analyze O6-methylguanine-DNA-methyltransferase in a series of 100 glioblastoma patients. *Cancer* 2012; 118(17):4201-4211.
- (173) Etcheverry A, Aubry M, De TM et al. DNA methylation in glioblastoma: impact on gene expression and clinical outcome. *BMC Genomics* 2010; 11:701.
- (174) Fabry Z, Raine CS, Hart MN. Nervous tissue as an immune compartment: the dialect of the immune response in the CNS. *Immunol Today* 1994; 15(5):218-224.
- (175) de Vries NA, Beijnen JH, Boogerd W, van TO. Blood-brain barrier and chemotherapeutic treatment of brain tumors. *Expert Rev Neurother* 2006; 6(8):1199-1209.
- (176) Gigliotti F, Lee D, Insel RA, Scheld WM. IgG penetration into the cerebrospinal fluid in a rabbit model of meningitis. *J Infect Dis* 1987; 156(2):394-398.
- (177) Pachter JS, de Vries HE, Fabry Z. The blood-brain barrier and its role in immune privilege in the central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003; 62(6):593-604.
- (178) Bailey SL, Carpentier PA, McMahon EJ, Begolka WS, Miller SD. Innate and adaptive immune responses of the central nervous system. *Crit Rev Immunol* 2006; 26(2):149-188.
- (179) Hattiangady B, Shuai B, Cai J, Coksaygan T, Rao MS, Shetty AK. Increased dentate neurogenesis after grafting of glial restricted progenitors or neural stem cells in the aging hippocampus. *Stem Cells* 2007; 25(8):2104-2117.
- (180) Mueller D, Shamlott MJ, Fox HE, Gearhart JD, Martin LJ. Transplanted human embryonic germ cell-derived neural stem cells replace neurons and oligodendrocytes in the forebrain of neonatal mice with excitotoxic brain damage. *J Neurosci Res* 2005; 82(5):592-608.

- (181) Sloan DJ, Wood MJ, Charlton HM. The immune response to intracerebral neural grafts. *Trends Neurosci* 1991; 14(8):341-346.
- (182) Tambur AR. Transplantation immunology and the central nervous system. *Neurol Res* 2004; 26(3):243-255.
- (183) Karman J, Ling C, Sandor M, Fabry Z. Initiation of immune responses in brain is promoted by local dendritic cells. *J Immunol* 2004; 173(4):2353-2361.
- (184) Calzascia T, Masson F, Di Berardino-Besson W et al. Homing phenotypes of tumor-specific CD8 T cells are predetermined at the tumor site by crosspresenting APCs. *Immunity* 2005; 22(2):175-184.
- (185) Hussain SF, Yang D, Suki D, Grimm E, Heimberger AB. Innate immune functions of microglia isolated from human glioma patients. *J Transl Med* 2006; 4:15.
- (186) Yang I, Han SJ, Kaur G, Crane C, Parsa AT. The role of microglia in central nervous system immunity and glioma immunology. *J Clin Neurosci* 2010; 17(1):6-10.
- (187) Wu A, Wei J, Kong LY et al. Glioma cancer stem cells induce immunosuppressive macrophages/microglia. *Neuro Oncol* 2010; 12(11):1113-1125.
- (188) Tang J, Flomenberg P, Harshyne L, Kenyon L, Andrews DW. Glioblastoma patients exhibit circulating tumor-specific CD8+ T cells. *Clin Cancer Res* 2005; 11(14):5292-5299.
- (189) Bucciero A, Vizioli L, Giamundo A, Villano M, Quaglietta P, Cerillo A. Prognostic significance of lymphoid infiltration in cerebral malignant gliomas. *J Neurosurg Sci* 1990; 34(2):145-148.
- (190) Donson AM, Birks DK, Schittone SA et al. Increased immune gene expression and immune cell infiltration in high-grade astrocytoma distinguish long-term from short-term survivors. *J Immunol* 2012; 189(4):1920-1927.
- (191) Dunn GP, Dunn IF, Curry WT. Focus on TILs: Prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human glioma. *Cancer Immun* 2007; 7:12.
- (192) Lohr J, Ratliff T, Huppertz A et al. Effector T-cell infiltration positively impacts survival of glioblastoma patients and is impaired by tumor-derived TGF-beta. *Clin Cancer Res* 2011; 17(13):4296-4308.
- (193) Vauleon E, Avril T, Collet B, Mosser J, Quillien V. Overview of cellular immunotherapy for patients with glioblastoma. *Clin Dev Immunol* 2010; 2010:article ID 689171.
- (194) Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F et al. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 1996; 2(1):52-58.
- (195) Yu JS, Wheeler CJ, Zeltzer PM et al. Vaccination of malignant glioma patients with peptide-pulsed dendritic cells elicits systemic cytotoxicity and intracranial T-cell infiltration. *Cancer Res* 2001; 61(3):842-847.

- (196) Gulley JL, Drake CG. Immunotherapy for prostate cancer: recent advances, lessons learned, and areas for further research. *Clin Cancer Res* 2011; 17(12):3884-3891.
- (197) Ribas A, Comin-Anduix B, Chmielowski B et al. Dendritic cell vaccination combined with CTLA4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 2009; 15(19):6267-6276.
- (198) Robert C, Thomas L, Bondarenko I et al. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2011; 364(26):2517-2526.
- (199) Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144(5):646-674.
- (200) Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 2012; 366(26):2443-2454.
- (201) Godard S, Getz G, Delorenzi M et al. Classification of human astrocytic gliomas on the basis of gene expression: a correlated group of genes with angiogenic activity emerges as a strong predictor of subtypes. *Cancer Res* 2003; 63(20):6613-6625.
- (202) Ivliev AE, 't Hoen PA, Sergeeva MG. Coexpression network analysis identifies transcriptional modules related to proastrocytic differentiation and sprouty signaling in glioma. *Cancer Res* 2010; 70(24):10060-10070.
- (203) Shirahata M, Iwao-Koizumi K, Saito S et al. Gene expression-based molecular diagnostic system for malignant gliomas is superior to histological diagnosis. *Clin Cancer Res* 2007; 13(24):7341-7356.
- (204) Ducray F, de RA, Chinot O et al. An ANOCEF genomic and transcriptomic microarray study of the response to radiotherapy or to alkylating first-line chemotherapy in glioblastoma patients. *Mol Cancer* 2010; 9:234.
- (205) Horvath S, Zhang B, Carlson M et al. Analysis of oncogenic signaling networks in glioblastoma identifies ASPM as a molecular target. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(46):17402-17407.
- (206) Liang Y, Diehn M, Watson N et al. Gene expression profiling reveals molecularly and clinically distinct subtypes of glioblastoma multiforme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(16):5814-5819.
- (207) Marko NF, Toms SA, Barnett GH, Weil R. Genomic expression patterns distinguish long-term from short-term glioblastoma survivors: a preliminary feasibility study. *Genomics* 2008; 91(5):395-406.
- (208) Murat A, Migliavacca E, Gorlia T et al. Stem cell-related "self-renewal" signature and high epidermal growth factor receptor expression associated with resistance to concomitant chemoradiotherapy in glioblastoma. *J Clin Oncol* 2008; 26(18):3015-3024.
- (209) Tso CL, Freije WA, Day A et al. Distinct transcription profiles of primary and secondary glioblastoma subgroups. *Cancer Res* 2006; 66(1):159-167.

- (210) Chang H, Fontenay GV, Han J et al. Morphometric analysis of TCGA glioblastoma multiforme. *BMC Bioinformatics* 2011; 12:484.
- (211) Engler JR, Robinson AE, Smirnov I et al. Increased microglia/macrophage gene expression in a subset of adult and pediatric astrocytomas. *PLoS One* 2012; 7(8):e43339.
- (212) Huang H, Colella S, Kurrer M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Gene expression profiling of low-grade diffuse astrocytomas by cDNA arrays. *Cancer Res* 2000; 60(24):6868-6874.
- (213) Li Y, Guessous F, Zhang Y et al. MicroRNA-34a inhibits glioblastoma growth by targeting multiple oncogenes. *Cancer Res* 2009; 69(19):7569-7576.
- (214) Mischel PS, Shai R, Shi T et al. Identification of molecular subtypes of glioblastoma by gene expression profiling. *Oncogene* 2003; 22(15):2361-2373.
- (215) Rich JN, Hans C, Jones B et al. Gene expression profiling and genetic markers in glioblastoma survival. *Cancer Res* 2005; 65(10):4051-4058.
- (216) Xu XL, Kapoun AM. Heterogeneous activation of the TGFbeta pathway in glioblastomas identified by gene expression-based classification using TGFbeta-responsive genes. *J Transl Med* 2009; 7:12.
- (217) Zhang J, Liu B, Jiang X et al. A systems biology-based gene expression classifier of glioblastoma predicts survival with solid tumors. *PLoS One* 2009; 4(7):e6274.
- (218) Li A, Walling J, Ahn S et al. Unsupervised analysis of transcriptomic profiles reveals six glioma subtypes. *Cancer Res* 2009; 69(5):2091-2099.
- (219) Sallinen SL, Sallinen PK, Haapasalo HK et al. Identification of differentially expressed genes in human gliomas by DNA microarray and tissue chip techniques. *Cancer Res* 2000; 60(23):6617-6622.
- (220) Kim S, Dougherty ER, Shmulevich I et al. Identification of combination gene sets for glioma classification. *Mol Cancer Ther* 2002; 1(13):1229-1236.
- (221) Freije WA, Castro-Vargas FE, Fang Z et al. Gene expression profiling of gliomas strongly predicts survival. *Cancer Res* 2004; 64(18):6503-6510.
- (222) Hoelzinger DB, Mariani L, Weis J et al. Gene expression profile of glioblastoma multiforme invasive phenotype points to new therapeutic targets. *Neoplasia* 2005; 7(1):7-16.
- (223) Persson O, Krogh M, Saal LH et al. Microarray analysis of gliomas reveals chromosomal position-associated gene expression patterns and identifies potential immunotherapy targets. *J Neurooncol* 2007; 85(1):11-24.
- (224) Reddy SP, Britto R, Vinnakota K et al. Novel glioblastoma markers with diagnostic and prognostic value identified through transcriptome analysis. *Clin Cancer Res* 2008; 14(10):2978-2987.

- (225) Shirahata M, Oba S, Iwao-Koizumi K et al. Using gene expression profiling to identify a prognostic molecular spectrum in gliomas. *Cancer Sci* 2009; 100(1):165-172.
- (226) Garcia JL, Perez-Caro M, Gomez-Moreta JA et al. Molecular analysis of ex-vivo CD133+ GBM cells revealed a common invasive and angiogenic profile but different proliferative signatures among high grade gliomas. *BMC Cancer* 2010; 10:454.
- (227) Duarte CW, Willey CD, Zhi D et al. Expression signature of IFN/STAT1 signaling genes predicts poor survival outcome in glioblastoma multiforme in a subtype-specific manner. *PLoS One* 2012; 7(1):e29653.
- (228) Cooper LA, Gutman DA, Chisolm C et al. The tumor microenvironment strongly impacts master transcriptional regulators and gene expression class of glioblastoma. *Am J Pathol* 2012; 180(5):2108-2119.
- (229) Zapf J, Kiefer M, Merryweather J et al. Isolation from adult human serum of four insulin-like growth factor (IGF) binding proteins and molecular cloning of one of them that is increased by IGF I administration and in extrapancreatic tumor hypoglycemia. *J Biol Chem* 1990; 265(25):14892-14898.
- (230) Kanety H, Madjar Y, Dagan Y et al. Serum insulin-like growth factor-binding protein-2 (IGFBP-2) is increased and IGFBP-3 is decreased in patients with prostate cancer: correlation with serum prostate-specific antigen. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77(1):229-233.
- (231) Flyvbjerg A, Mogensen O, Mogensen B, Nielsen OS. Elevated serum insulin-like growth factor-binding protein 2 (IGFBP-2) and decreased IGFBP-3 in epithelial ovarian cancer: correlation with cancer antigen 125 and tumor-associated trypsin inhibitor. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(7):2308-2313.
- (232) Busund LT, Richardsen E, Busund R et al. Significant expression of IGFBP2 in breast cancer compared with benign lesions. *J Clin Pathol* 2005; 58(4):361-366.
- (233) El Atiq F, Garrouste F, Remacle-Bonnet M, Sastre B, Pommier G. Alterations in serum levels of insulin-like growth factors and insulin-like growth-factor-binding proteins in patients with colorectal cancer. *Int J Cancer* 1994; 57(4):491-497.
- (234) Fuller GN, Rhee CH, Hess KR et al. Reactivation of insulin-like growth factor binding protein 2 expression in glioblastoma multiforme: a revelation by parallel gene expression profiling. *Cancer Res* 1999; 59(17):4228-4232.
- (235) Lee WH, Michels KM, Bondy CA. Localization of insulin-like growth factor binding protein-2 messenger RNA during postnatal brain development: correlation with insulin-like growth factors I and II. *Neuroscience* 1993; 53(1):251-265.
- (236) Li Y, Jiang T, Zhang J et al. Elevated serum antibodies against insulin-like growth factor-binding protein-2 allow detecting early-stage cancers: evidences from glioma and colorectal carcinoma studies. *Ann Oncol* 2012; 23(9):2415-2422.

- (237) Lin Y, Jiang T, Zhou K et al. Plasma IGFBP-2 levels predict clinical outcomes of patients with high-grade gliomas. *Neuro Oncol* 2009; 11(5):468-476.
- (238) Hsieh D, Hsieh A, Stea B, Ellsworth R. IGFBP2 promotes glioma tumor stem cell expansion and survival. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 397(2):367-372.
- (239) McDonald KL, O'Sullivan MG, Parkinson JF et al. IQGAP1 and IGFBP2: valuable biomarkers for determining prognosis in glioma patients. *J Neuropathol Exp Neurol* 2007; 66(5):405-417.
- (240) Hwa V, Oh Y, Rosenfeld RG. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr Rev* 1999; 20(6):761-787.
- (241) Hoeflich A, Fetscher O, Lahm H et al. Overexpression of insulin-like growth factor-binding protein-2 results in increased tumorigenic potential in Y-1 adrenocortical tumor cells. *Cancer Res* 2000; 60(4):834-838.
- (242) Menouny M, Binoux M, Babajko S. IGFBP-2 expression in a human cell line is associated with increased IGFBP-3 proteolysis, decreased IGFBP-1 expression and increased tumorigenicity. *Int J Cancer* 1998; 77(6):874-879.
- (243) Dunlap SM, Celestino J, Wang H et al. Insulin-like growth factor binding protein 2 promotes glioma development and progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(28):11736-11741.
- (244) Mehrian-Shai R, Chen CD, Shi T et al. Insulin growth factor-binding protein 2 is a candidate biomarker for PTEN status and PI3K/Akt pathway activation in glioblastoma and prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(13):5563-5568.
- (245) Moore LM, Holmes KM, Smith SM et al. IGFBP2 is a candidate biomarker for Ink4a-Arf status and a therapeutic target for high-grade gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106(39):16675-16679.
- (246) Wang H, Wang H, Shen W et al. Insulin-like growth factor binding protein 2 enhances glioblastoma invasion by activating invasion-enhancing genes. *Cancer Res* 2003; 63(15):4315-4321.
- (247) Schutt BS, Langkamp M, Rauschnabel U, Ranke MB, Elmlinger MW. Integrin-mediated action of insulin-like growth factor binding protein-2 in tumor cells. *J Mol Endocrinol* 2004; 32(3):859-868.
- (248) Wang GK, Hu L, Fuller GN, Zhang W. An interaction between insulin-like growth factor-binding protein 2 (IGFBP2) and integrin alpha5 is essential for IGFBP2-induced cell mobility. *J Biol Chem* 2006; 281(20):14085-14091.
- (249) Ramaswamy S, Ross KN, Lander ES, Golub TR. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet* 2003; 33(1):49-54.
- (250) Holmes KM, Annala M, Chua CY et al. Insulin-like growth factor-binding protein 2-driven glioma progression is prevented by blocking a clinically significant integrin,

integrin-linked kinase, and NF-kappaB network. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109(9):3475-3480.

- (251) Song SW, Fuller GN, Khan A et al. Iip45, an insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP-2) binding protein, antagonizes IGFBP-2 stimulation of glioma cell invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(24):13970-13975.
- (252) Rorive S, Berton A, D'haene N et al. Matrix metalloproteinase-9 interplays with the IGFBP2-IGFII complex to promote cell growth and motility in astrocytomas. *Glia* 2008; 56(15):1679-1690.
- (253) Elmlinger MW, Deininger MH, Schuett BS et al. In vivo expression of insulin-like growth factor-binding protein-2 in human gliomas increases with the tumor grade. *Endocrinology* 2001; 142(4):1652-1658.
- (254) Hettmer S, Dannecker L, Foell J, Elmlinger MW, Dannecker GE. Effects of insulin-like growth factors and insulin-like growth factor binding protein-2 on the in vitro proliferation of peripheral blood mononuclear cells. *Hum Immunol* 2005; 66(2):95-103.
- (255) Park KH, Gad E, Goodell V et al. Insulin-like growth factor-binding protein-2 is a target for the immunomodulation of breast cancer. *Cancer Res* 2008; 68(20):8400-8409.
- (256) Dutoit V, Herold-Mende C, Hilf N et al. Exploiting the glioblastoma peptidome to discover novel tumour-associated antigens for immunotherapy. *Brain* 2012; 135(Pt 4):1042-1054.
- (257) Suvasini R, Shruti B, Thota B et al. Insulin growth factor-2 binding protein 3 (IGF2BP3) is a glioblastoma-specific marker that activates phosphatidylinositol 3-kinase/mitogen-activated protein kinase (PI3K/MAPK) pathways by modulating IGF-2. *J Biol Chem* 2011; 286(29):25882-25890.
- (258) Gettins PG. Serpin structure, mechanism, and function. *Chem Rev* 2002; 102(12):4751-4804.
- (259) Seixas S, Ivanova N, Ferreira Z, Rocha J, Victor BL. Loss and gain of function in SERPINB11: an example of a gene under selection on standing variation, with implications for host-pathogen interactions. *PLoS One* 2012; 7(2):e32518.
- (260) Bajou K, Noel A, Gerard RD et al. Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularization. *Nat Med* 1998; 4(8):923-928.
- (261) Levicar N, Nuttall RK, Lah TT. Proteases in brain tumour progression. *Acta Neurochir (Wien)* 2003; 145(9):825-838.
- (262) Rao JS. Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(7):489-501.
- (263) Collie-Duguid ES, Sweeney K, Stewart KN, Miller ID, Smyth E, Heys SD. SerpinB3, a new prognostic tool in breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 132(3):807-818.

- (264) Lim W, Kim HS, Jeong W et al. SERPINB3 in the chicken model of ovarian cancer: a prognostic factor for platinum resistance and survival in patients with epithelial ovarian cancer. *PLoS One* 2012; 7(11):e49869.
- (265) Petty RD, Kerr KM, Murray GI et al. Tumor transcriptome reveals the predictive and prognostic impact of lysosomal protease inhibitors in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2006; 24(11):1729-1744.
- (266) Iwadate Y, Hayama M, Adachi A et al. High serum level of plasminogen activator inhibitor-1 predicts histological grade of intracerebral gliomas. *Anticancer Res* 2008; 28(1B):415-418.
- (267) Osmak M, Vrhovec I, Skrk J. Cisplatin resistant glioblastoma cells may have increased concentration of urokinase plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1. *J Neurooncol* 1999; 42(2):95-102.
- (268) Landau BJ, Kwaan HC, Verrusio EN, Brem SS. Elevated levels of urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type-1 in malignant human brain tumors. *Cancer Res* 1994; 54(4):1105-1108.
- (269) Colin C, Voutsinos-Porche B, Nanni I et al. High expression of cathepsin B and plasminogen activator inhibitor type-1 are strong predictors of survival in glioblastomas. *Acta Neuropathol* 2009; 118(6):745-754.
- (270) Kono S, Rao JS, Bruner JM, Sawaya R. Immunohistochemical localization of plasminogen activator inhibitor type 1 in human brain tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* 1994; 53(3):256-262.
- (271) Hjortland GO, Lillehammer T, Somme S et al. Plasminogen activator inhibitor-1 increases the expression of VEGF in human glioma cells. *Exp Cell Res* 2004; 294(1):130-139.
- (272) Gerwin BI, Keski-Oja J, Seddon M, Lechner JF, Harris CC. TGF-beta 1 modulation of urokinase and PAI-1 expression in human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol* 1990; 259(4 Pt 1):L262-L269.
- (273) Dennler S, Itoh S, Vivien D, ten DP, Huet S, Gauthier JM. Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *EMBO J* 1998; 17(11):3091-3100.
- (274) Keeton MR, Curriden SA, van Zonneveld AJ, Loskutoff DJ. Identification of regulatory sequences in the type 1 plasminogen activator inhibitor gene responsive to transforming growth factor beta. *J Biol Chem* 1991; 266(34):23048-23052.
- (275) Kimura M, Soeda S, Oda M et al. Release of plasminogen activator inhibitor-1 from human astrocytes is regulated by intracellular ceramide. *J Neurosci Res* 2000; 62(6):781-788.
- (276) Treichel JA, Reddington M, Kreutzberg GW. Regulation of plasminogen activator inhibitor-1 mRNA accumulation by basic fibroblast growth factor and transforming growth factor-beta1 in cultured rat astrocytes. *J Neurochem* 1998; 71(5):1944-1952.

- (277) Oh JW, Olman M, Benveniste EN. CXCL12-mediated induction of plasminogen activator inhibitor-1 expression in human CXCR4 positive astrogloma cells. *Biol Pharm Bull* 2009; 32(4):573-577.
- (278) Farley K, Stolley JM, Zhao P, Cooley J, Remold-O'Donnell E. A serpinB1 regulatory mechanism is essential for restricting neutrophil extracellular trap generation. *J Immunol* 2012; 189(9):4574-4581.
- (279) Gatto M, Iaccarino L, Ghirardello A et al. Serpins, Immunity and Autoimmunity: Old Molecules, New Functions. *Clin Rev Allergy Immunol* 2013.
- (280) Liu D, Lu F, Qin G, Fernandes SM, Li J, Davis AE, III. C1 inhibitor-mediated protection from sepsis. *J Immunol* 2007; 179(6):3966-3972.
- (281) Haziot A, Rong GW, Silver J, Goyert SM. Recombinant soluble CD14 mediates the activation of endothelial cells by lipopolysaccharide. *J Immunol* 1993; 151(3):1500-1507.
- (282) Simmons DL, Tan S, Tenen DG, Nicholson-Weller A, Seed B. Monocyte antigen CD14 is a phospholipid anchored membrane protein. *Blood* 1989; 73(1):284-289.
- (283) Haziot A, Chen S, Ferrero E, Low MG, Silber R, Goyert SM. The monocyte differentiation antigen, CD14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol linkage. *J Immunol* 1988; 141(2):547-552.
- (284) Nagai Y, Akashi S, Nagafuku M et al. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat Immunol* 2002; 3(7):667-672.
- (285) Shimazu R, Akashi S, Ogata H et al. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 1999; 189(11):1777-1782.
- (286) Ranoa DR, Kelley SL, Tapping RI. Human LBP and CD14 independently deliver triacylated lipoproteins to TLR1 and TLR2 and enhance formation of the ternary signaling complex. *J Biol Chem* 2013.
- (287) Karagiannis SN, Bracher MG, Hunt J et al. IgE-antibody-dependent immunotherapy of solid tumors: cytotoxic and phagocytic mechanisms of eradication of ovarian cancer cells. *J Immunol* 2007; 179(5):2832-2843.
- (288) Fu SL, Pierre J, Smith-Norowitz TA et al. Immunoglobulin E antibodies from pancreatic cancer patients mediate antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity against pancreatic cancer cells. *Clin Exp Immunol* 2008; 153(3):401-409.
- (289) Chen R, Alvero AB, Silasi DA, Steffensen KD, Mor G. Cancers take their Toll--the function and regulation of Toll-like receptors in cancer cells. *Oncogene* 2008; 27(2):225-233.
- (290) Tewari R, Choudhury SR, Ghosh S, Mehta VS, Sen E. Involvement of TNFalpha-induced TLR4-NF-kappaB and TLR4-HIF-1alpha feed-forward loops in the regulation of inflammatory responses in glioma. *J Mol Med (Berl)* 2012; 90(1):67-80.

- (291) Chicoine MR, Zahner M, Won EK et al. The in vivo antitumoral effects of lipopolysaccharide against glioblastoma multiforme are mediated in part by Toll-like receptor 4. *Neurosurgery* 2007; 60(2):372-380.
- (292) Meng Y, Kujas M, Marie Y et al. Expression of TLR9 within human glioblastoma. *J Neurooncol* 2008; 88(1):19-25.
- (293) El Andaloussi A, Sonabend AM, Han Y, Lesniak MS. Stimulation of TLR9 with CpG ODN enhances apoptosis of glioma and prolongs the survival of mice with experimental brain tumors. *Glia* 2006; 54(6):526-535.
- (294) Carpentier A, Metellus P, Ursu R et al. Intracerebral administration of CpG oligonucleotide for patients with recurrent glioblastoma: a phase II study. *Neuro Oncol* 2010; 12(4):401-408.
- (295) Krause CD, Pestka S. Evolution of the Class 2 cytokines and receptors, and discovery of new friends and relatives. *Pharmacol Ther* 2005; 106(3):299-346.
- (296) Dumoutier L, Tounsi A, Michiels T, Sommereyns C, Kotenko SV, Renauld JC. Role of the interleukin (IL)-28 receptor tyrosine residues for antiviral and antiproliferative activity of IL-29/interferon-lambda 1: similarities with type I interferon signaling. *J Biol Chem* 2004; 279(31):32269-32274.
- (297) Adamkova L, Souckova K, Kovarik J. Transcription protein STAT1: biology and relation to cancer. *Folia Biol (Praha)* 2007; 53(1):1-6.
- (298) Darnell JE Jr. STATs and gene regulation. *Science* 1997; 277(5332):1630-1635.
- (299) Dimco G, Knight RA, Latchman DS, Stephanou A. STAT1 interacts directly with cyclin D1/Cdk4 and mediates cell cycle arrest. *Cell Cycle* 2010; 9(23):4638-4649.
- (300) Hertzog PJ, Hwang SY, Kola I. Role of interferons in the regulation of cell proliferation, differentiation, and development. *Mol Reprod Dev* 1994; 39(2):226-232.
- (301) Khodarev NN, Beckett M, Labay E, Darga T, Roizman B, Weichselbaum RR. STAT1 is overexpressed in tumors selected for radioresistance and confers protection from radiation in transduced sensitive cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(6):1714-1719.
- (302) Pitroda SP, Wakim BT, Sood RF et al. STAT1-dependent expression of energy metabolic pathways links tumour growth and radioresistance to the Warburg effect. *BMC Med* 2009; 7:68.
- (303) Goldstein OG, Hajiaghamohseni LM, Amria S, Sundaram K, Reddy SV, Haque A. Gamma-IFN-inducible-lysosomal thiol reductase modulates acidic proteases and HLA class II antigen processing in melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 2008; 57(10):1461-1470.
- (304) Arunachalam B, Phan UT, Geuze HJ, Cresswell P. Enzymatic reduction of disulfide bonds in lysosomes: characterization of a gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase (GILT). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(2):745-750.

- (305) Tanaka SS, Yamaguchi YL, Tsoi B, Lickert H, Tam PP. IFITM/Mil/fragilis family proteins IFITM1 and IFITM3 play distinct roles in mouse primordial germ cell homing and repulsion. *Dev Cell* 2005; 9(6):745-756.
- (306) Yang ZF, Ho DW, Lau CK et al. Allograft inflammatory factor-1 (AIF-1) is crucial for the survival and pro-inflammatory activity of macrophages. *Int Immunol* 2005; 17(11):1391-1397.
- (307) Deininger MH, Seid K, Engel S, Meyermann R, Schluesener HJ. Allograft inflammatory factor-1 defines a distinct subset of infiltrating macrophages/microglial cells in rat and human gliomas. *Acta Neuropathol* 2000; 100(6):673-680.
- (308) Haynes BF, Telen MJ, Hale LP, Denning SM. CD44--a molecule involved in leukocyte adherence and T-cell activation. *Immunol Today* 1989; 10(12):423-428.
- (309) Gunthert U, Hofmann M, Rudy W et al. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* 1991; 65(1):13-24.
- (310) Ponta H, Sherman L, Herrlich PA. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4(1):33-45.
- (311) Seiter S, Arch R, Reber S et al. Prevention of tumor metastasis formation by anti-variant CD44. *J Exp Med* 1993; 177(2):443-455.
- (312) Chetty C, Vanamala SK, Gondi CS, Dinh DH, Gujrati M, Rao JS. MMP-9 induces CD44 cleavage and CD44 mediated cell migration in glioblastoma xenograft cells. *Cell Signal* 2012; 24(2):549-559.
- (313) Nagano O, Saya H. Mechanism and biological significance of CD44 cleavage. *Cancer Sci* 2004; 95(12):930-935.
- (314) Nakamura H, Suenaga N, Taniwaki K et al. Constitutive and induced CD44 shedding by ADAM-like proteases and membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *Cancer Res* 2004; 64(3):876-882.
- (315) Birchmeier C, Gherardi E. Developmental roles of HGF/SF and its receptor, the c-Met tyrosine kinase. *Trends Cell Biol* 1998; 8(10):404-410.
- (316) Orian-Rousseau V, Chen L, Sleeman JP, Herrlich P, Ponta H. CD44 is required for two consecutive steps in HGF/c-Met signaling. *Genes Dev* 2002; 16(23):3074-3086.
- (317) Nestl A, Von Stein OD, Zatloukal K et al. Gene expression patterns associated with the metastatic phenotype in rodent and human tumors. *Cancer Res* 2001; 61(4):1569-1577.
- (318) Gao AC, Lou W, Dong JT, Isaacs JT. CD44 is a metastasis suppressor gene for prostatic cancer located on human chromosome 11p13. *Cancer Res* 1997; 57(5):846-849.

- (319) Iczkowski KA, Omara-Opyene AL, Shah GV. The predominant CD44 splice variant in prostate cancer binds fibronectin, and calcitonin stimulates its expression. *Anticancer Res* 2006; 26(4B):2863-2872.
- (320) Morrison H, Sherman LS, Legg J et al. The NF2 tumor suppressor gene product, merlin, mediates contact inhibition of growth through interactions with CD44. *Genes Dev* 2001; 15(8):968-980.
- (321) Rouleau GA, Merel P, Lutchman M et al. Alteration in a new gene encoding a putative membrane-organizing protein causes neuro-fibromatosis type 2. *Nature* 1993; 363(6429):515-521.
- (322) Claesson L, Larhammar D, Rask L, Peterson PA. cDNA clone for the human invariant gamma chain of class II histocompatibility antigens and its implications for the protein structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983; 80(24):7395-7399.
- (323) Kudo J, Chao LY, Narni F, Saunders GF. Structure of the human gene encoding the invariant gamma-chain of class II histocompatibility antigens. *Nucleic Acids Res* 1985; 13(24):8827-8841.
- (324) Cresswell P. Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu Rev Immunol* 1994; 12:259-293.
- (325) Leng L, Metz CN, Fang Y et al. MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *J Exp Med* 2003; 197(11):1467-1476.
- (326) Fan H, Hall P, Santos LL et al. Macrophage migration inhibitory factor and CD74 regulate macrophage chemotactic responses via MAPK and Rho GTPase. *J Immunol* 2011; 186(8):4915-4924.
- (327) Schwartz V, Lue H, Kraemer S et al. A functional heteromeric MIF receptor formed by CD74 and CXCR4. *FEBS Lett* 2009; 583(17):2749-2757.
- (328) Shi X, Leng L, Wang T et al. CD44 is the signaling component of the macrophage migration inhibitory factor-CD74 receptor complex. *Immunity* 2006; 25(4):595-606.
- (329) Bernhagen J, Krohn R, Lue H et al. MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nat Med* 2007; 13(5):587-596.
- (330) Gregory JL, Morand EF, McKeown SJ et al. Macrophage migration inhibitory factor induces macrophage recruitment via CC chemokine ligand 2. *J Immunol* 2006; 177(11):8072-8079.
- (331) Nishimura T, Horino K, Nishiura H et al. Apoptotic cells of an epithelial cell line, AsPC-1, release monocyte chemotactic S19 ribosomal protein dimer. *J Biochem* 2001; 129(3):445-454.
- (332) Filip AM, Klug J, Cayli S et al. Ribosomal protein S19 interacts with macrophage migration inhibitory factor and attenuates its pro-inflammatory function. *J Biol Chem* 2009; 284(12):7977-7985.

- (333) Bacher M, Schrader J, Thompson N et al. Up-regulation of macrophage migration inhibitory factor gene and protein expression in glial tumor cells during hypoxic and hypoglycemic stress indicates a critical role for angiogenesis in glioblastoma multiforme. *Am J Pathol* 2003; 162(1):11-17.
- (334) Wang XB, Tian XY, Li Y, Li B, Li Z. Elevated expression of macrophage migration inhibitory factor correlates with tumor recurrence and poor prognosis of patients with gliomas. *J Neurooncol* 2012; 106(1):43-51.
- (335) Mittelbronn M, Platten M, Zeiner P et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) expression in human malignant gliomas contributes to immune escape and tumour progression. *Acta Neuropathol* 2011; 122(3):353-365.
- (336) Burnet FM. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 1970; 13:1-27.
- (337) Hoption Cann SA, van Netten JP, van NC. Dr William Coley and tumour regression: a place in history or in the future. *Postgrad Med J* 2003; 79(938):672-680.
- (338) Catros-Quemener V, Bouet F, Genetet N. [Antitumor immunity and cellular cancer therapies]. *Med Sci (Paris)* 2003; 19(1):43-53.
- (339) Romani L, Puccetti P, Fioretti MC, Mage MG. Humoral response against murine lymphoma cells xenogenized by drug treatment in vivo. *Int J Cancer* 1985; 36(2):225-231.
- (340) Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; 299(5609):1057-1061.
- (341) Curiel TJ, Coukos G, Zou L et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 2004; 10(9):942-949.
- (342) Barnett JC, Bean SM, Whitaker RS et al. Ovarian cancer tumor infiltrating T-regulatory (T(reg)) cells are associated with a metastatic phenotype. *Gynecol Oncol* 2010; 116(3):556-562.
- (343) Bronte V, Apolloni E, Cabrelle A et al. Identification of a CD11b(+)/Gr-1(+)/CD31(+) myeloid progenitor capable of activating or suppressing CD8(+) T cells. *Blood* 2000; 96(12):3838-3846.
- (344) Gabrilovich DI, Bronte V, Chen SH et al. The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res* 2007; 67(1):425.
- (345) Yang L, DeBusk LM, Fukuda K et al. Expansion of myeloid immune suppressor Gr+CD11b+ cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis. *Cancer Cell* 2004; 6(4):409-421.
- (346) Fernandez Pujol B, Lucibello FC, Gehling UM et al. Endothelial-like cells derived from human CD14 positive monocytes. *Differentiation* 2000; 65(5):287-300.

- (347) Kuwana M, Okazaki Y, Kodama H, Satoh T, Kawakami Y, Ikeda Y. Endothelial differentiation potential of human monocyte-derived multipotential cells. *Stem Cells* 2006; 24(12):2733-2743.
- (348) Nelson BH. The impact of T-cell immunity on ovarian cancer outcomes. *Immunol Rev* 2008; 222:101-116.
- (349) Pages F, Kirilovsky A, Mlecnik B et al. In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27(35):5944-5951.
- (350) del Rio-Hortega P, de Asua R. Sobre la fagocitosis en los tumores y en otros procesos patológicos. *Arch Cardiol Hematol* 1921; 2(5):161-220.
- (351) Penfield W. Microglia and the Process of Phagocytosis in Gliomas. *Am J Pathol* 1925; 1(1):77-90.
- (352) Hitchcock ER, Morris CS. Mononuclear cell infiltration in central portions of human astrocytomas. *J Neurosurg* 1988; 68(3):432-437.
- (353) Atai NA, Bansal M, Lo C et al. Osteopontin is up-regulated and associated with neutrophil and macrophage infiltration in glioblastoma. *Immunology* 2011; 132(1):39-48.
- (354) Giometto B, Bozza F, Faresin F, Alessio L, Mingrino S, Tavolato B. Immune infiltrates and cytokines in gliomas. *Acta Neurochir (Wien)* 1996; 138(1):50-56.
- (355) Komohara Y, Ohnishi K, Kuratsu J, Takeya M. Possible involvement of the M2 anti-inflammatory macrophage phenotype in growth of human gliomas. *J Pathol* 2008; 216(1):15-24.
- (356) Nishie A, Ono M, Shono T et al. Macrophage infiltration and heme oxygenase-1 expression correlate with angiogenesis in human gliomas. *Clin Cancer Res* 1999; 5(5):1107-1113.
- (357) Yang I, Han SJ, Sughrue ME, Tihan T, Parsa AT. Immune cell infiltrate differences in pilocytic astrocytoma and glioblastoma: evidence of distinct immunological microenvironments that reflect tumor biology. *J Neurosurg* 2011; 115(3):505-511.
- (358) Barcia CJr, Gomez A, Gallego-Sanchez JM et al. Infiltrating CTLs in human glioblastoma establish immunological synapses with tumorigenic cells. *Am J Pathol* 2009; 175(2):786-798.
- (359) Komohara Y, Horlad H, Ohnishi K et al. Importance of direct macrophage - Tumor cell interaction on progression of human glioma. *Cancer Sci* 2012; 103(12):2165-2172.
- (360) Parney IF, Waldron JS, Parsa AT. Flow cytometry and in vitro analysis of human glioma-associated macrophages. Laboratory investigation. *J Neurosurg* 2009; 110(3):572-582.

- (361) Rossi ML, Jones NR, Candy E et al. The mononuclear cell infiltrate compared with survival in high-grade astrocytomas. *Acta Neuropathol* 1989; 78(2):189-193.
- (362) Morimura T, Neuchrist C, Kitz K et al. Monocyte subpopulations in human gliomas: expression of Fc and complement receptors and correlation with tumor proliferation. *Acta Neuropathol* 1990; 80(3):287-294.
- (363) Hussain SF, Yang D, Suki D, Aldape K, Grimm E, Heimberger AB. The role of human glioma-infiltrating microglia/macrophages in mediating antitumor immune responses. *Neuro Oncol* 2006; 8(3):261-279.
- (364) Roggendorf W, Strupp S, Paulus W. Distribution and characterization of microglia/macrophages in human brain tumors. *Acta Neuropathol* 1996; 92(3):288-293.
- (365) Badie B, Schartner J. Role of microglia in glioma biology. *Microsc Res Tech* 2001; 54(2):106-113.
- (366) AlShakweer W, Alwelaie Y, Mankung AM, Graeber MB. Bone marrow-derived microglia in pilocytic astrocytoma. *Front Biosci (Elite Ed)* 2011; 3:371-379.
- (367) Okada M, Saio M, Kito Y et al. Tumor-associated macrophage/microglia infiltration in human gliomas is correlated with MCP-3, but not MCP-1. *Int J Oncol* 2009; 34(6):1621-1627.
- (368) Prat E, Baron P, Meda L et al. The human astrocytoma cell line U373MG produces monocyte chemotactic protein (MCP)-1 upon stimulation with beta-amyloid protein. *Neurosci Lett* 2000; 283(3):177-180.
- (369) Twardy DJ, Mott PL, Glazer EW. Monokine modulation of human astroglial cell production of granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. I. Effects of IL-1 alpha and IL-beta. *J Immunol* 1990; 144(6):2233-2241.
- (370) Held-Feindt J, Hattermann K, Muerkoster SS et al. CX3CR1 promotes recruitment of human glioma-infiltrating microglia/macrophages (GIMs). *Exp Cell Res* 2010; 316(9):1553-1566.
- (371) Sawada M, Suzumura A, Yamamoto H, Marunouchi T. Activation and proliferation of the isolated microglia by colony stimulating factor-1 and possible involvement of protein kinase C. *Brain Res* 1990; 509(1):119-124.
- (372) Zhang J, Sarkar S, Cua R, Zhou Y, Hader W, Yong VW. A dialog between glioma and microglia that promotes tumor invasiveness through the CCL2/CCR2/interleukin-6 axis. *Carcinogenesis* 2012; 33(2):312-319.
- (373) Yeh WL, Lu DY, Liou HC, Fu WM. A forward loop between glioma and microglia: glioma-derived extracellular matrix-activated microglia secrete IL-18 to enhance the migration of glioma cells. *J Cell Physiol* 2012; 227(2):558-568.

- (374) Lewis JS, Landers RJ, Underwood JC, Harris AL, Lewis CE. Expression of vascular endothelial growth factor by macrophages is up-regulated in poorly vascularized areas of breast carcinomas. *J Pathol* 2000; 192(2):150-158.
- (375) Huettner C, Czub S, Kerkau S, Roggendorf W, Tonn JC. Interleukin 10 is expressed in human gliomas in vivo and increases glioma cell proliferation and motility in vitro. *Anticancer Res* 1997; 17(5A):3217-3224.
- (376) Markovic DS, Glass R, Synowitz M, Rooijen N, Kettenmann H. Microglia stimulate the invasiveness of glioma cells by increasing the activity of metalloprotease-2. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005; 64(9):754-762.
- (377) Wagner S, Czub S, Greif M et al. Microglial/macrophage expression of interleukin 10 in human glioblastomas. *Int J Cancer* 1999; 82(1):12-16.
- (378) Watters JJ, Schartner JM, Badie B. Microglia function in brain tumors. *J Neurosci Res* 2005; 81(3):447-455.
- (379) Zhai H, Heppner FL, Tsirka SE. Microglia/macrophages promote glioma progression. *Glia* 2011; 59(3):472-485.
- (380) Ridley A, Cavanagh JB. Lymphocytic infiltration in gliomas: evidence of possible host resistance. *Brain* 1971; 94(1):117-124.
- (381) Brooks WH, Markesbery WR, Gupta GD, Roszman TL. Relationship of lymphocyte invasion and survival of brain tumor patients. *Ann Neurol* 1978; 4(3):219-224.
- (382) Di Lorenzo N, Palma L, Nicole S. Lymphocytic infiltration in long-survival glioblastomas: possible host's resistance. *Acta Neurochir (Wien)* 1977; 39(1-2):27-33.
- (383) Palma L, Di LN, Guidetti B. Lymphocytic infiltrates in primary glioblastomas and recidivous gliomas. Incidence, fate, and relevance to prognosis in 228 operated cases. *J Neurosurg* 1978; 49(6):854-861.
- (384) Schiffer D, Cavicchioli D, Giordana MT, Palmucci L, Piazza A. Analysis of some factors effecting survival in malignant gliomas. *Tumori* 1979; 65(1):119-125.
- (385) Takeuchi J, Barnard RO. Perivascular lymphocytic cuffing in astrocytomas. *Acta Neuropathol* 1976; 35(3):265-271.
- (386) Heimberger AB, Sun W, Hussain SF et al. Immunological responses in a patient with glioblastoma multiforme treated with sequential courses of temozolomide and immunotherapy: case study. *Neuro Oncol* 2008; 10(1):98-103.
- (387) Kim YH, Jung TY, Jung S et al. Tumour-infiltrating T-cell subpopulations in glioblastomas. *Br J Neurosurg* 2012; 26(1):21-27.
- (388) Safdari H, Hochberg FH, Richardson EP, Jr. Prognostic value of round cell (lymphocyte) infiltration in malignant gliomas. *Surg Neurol* 1985; 23(3):221-226.

- (389) Sawamura Y, Abe H, Aida T, Hosokawa M, Kobayashi H. Isolation and in vitro growth of glioma-infiltrating lymphocytes, and an analysis of their surface phenotypes. *J Neurosurg* 1988; 69(5):745-750.
- (390) Vaquero J, Coca S, Oya S, Martinez R, Ramiro J, Salazar FG. Presence and significance of NK cells in glioblastomas. *J Neurosurg* 1989; 70(5):728-731.
- (391) von Hanwehr RI, Hofman FM, Taylor CR, Apuzzo ML. Mononuclear lymphoid populations infiltrating the microenvironment of primary CNS tumors. Characterization of cell subsets with monoclonal antibodies. *J Neurosurg* 1984; 60(6):1138-1147.
- (392) Kuppner MC, Hamou MF, de TN. Immunohistological and functional analyses of lymphoid infiltrates in human glioblastomas. *Cancer Res* 1988; 48(23):6926-6932.
- (393) Paine JT, Handa H, Yamasaki T, Yamashita J, Miyatake S. Immunohistochemical analysis of infiltrating lymphocytes in central nervous system tumors. *Neurosurgery* 1986; 18(6):766-772.
- (394) Perrin G, Speiser D, Porret A, Quiquerez AL, Walker PR, Dietrich PY. Sister cytotoxic CD8+ T cell clones differing in natural killer inhibitory receptor expression in human astrocytoma. *Immunol Lett* 2002; 81(2):125-132.
- (395) Crane CA, Ahn BJ, Han SJ, Parsa AT. Soluble factors secreted by glioblastoma cell lines facilitate recruitment, survival, and expansion of regulatory T cells: implications for immunotherapy. *Neuro Oncol* 2012; 14(5):584-595.
- (396) Fecci PE, Sweeney AE, Grossi PM et al. Systemic anti-CD25 monoclonal antibody administration safely enhances immunity in murine glioma without eliminating regulatory T cells. *Clin Cancer Res* 2006; 12(14 Pt 1):4294-4305.
- (397) Jacobs JF, Idema AJ, Bol KF et al. Prognostic significance and mechanism of Treg infiltration in human brain tumors. *J Neuroimmunol* 2010; 225(1-2):195-199.
- (398) El Andaloussi A, Lesniak MS. An increase in CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in tumor-infiltrating lymphocytes of human glioblastoma multiforme. *Neuro Oncol* 2006; 8(3):234-243.
- (399) Wiencke JK, Accomando WP, Zheng S et al. Epigenetic biomarkers of T-cells in human glioma. *Epigenetics* 2012; 7(12).
- (400) Saito T, Tanaka R, Kouno M et al. [Immunohistological analysis of infiltrating lymphocyte subpopulations in gliomas and metastatic brain tumors]. *No To Shinkei* 1987; 39(4):339-345.
- (401) Stevens A, Kloter I, Roggendorf W. Inflammatory infiltrates and natural killer cell presence in human brain tumors. *Cancer* 1988; 61(4):738-743.
- (402) Yasuda K, Alderson T, Phillips J, Sikora K. Detection of lymphocytes in malignant gliomas by monoclonal antibodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1983; 46(8):734-737.

- (403) Prins RM, Soto H, Konkankit V et al. Gene expression profile correlates with T-cell infiltration and relative survival in glioblastoma patients vaccinated with dendritic cell immunotherapy. *Clin Cancer Res* 2011; 17(6):1603-1615.
- (404) Hayes RL, Koslow M, Hiesiger EM et al. Improved long term survival after intracavitary interleukin-2 and lymphokine-activated killer cells for adults with recurrent malignant glioma. *Cancer* 1995; 76(5):840-852.
- (405) Boker DK, Schonberg F, Gullotta F. Localized hypertrophic neuropathy--a rare, clinically almost unknown syndrome. *Clin Neuropathol* 1984; 3(5):228-230.
- (406) Wainwright DA, Balyasnikova IV, Chang AL et al. IDO expression in brain tumors increases the recruitment of regulatory T cells and negatively impacts survival. *Clin Cancer Res* 2012; 18(22):6110-6121.
- (407) Fecci PE, Ochiai H, Mitchell DA et al. Systemic CTLA-4 blockade ameliorates glioma-induced changes to the CD4+ T cell compartment without affecting regulatory T-cell function. *Clin Cancer Res* 2007; 13(7):2158-2167.
- (408) Hodi FS, Oble DA, Drappatz J et al. CTLA-4 blockade with ipilimumab induces significant clinical benefit in a female with melanoma metastases to the CNS. *Nat Clin Pract Oncol* 2008; 5(9):557-561.
- (409) Hayes RL, Arbit E, Odaimi M et al. Adoptive cellular immunotherapy for the treatment of malignant gliomas. *Crit Rev Oncol Hematol* 2001; 39(1-2):31-42.
- (410) Gleich GJ, Adolphson CR, Leiferman KM. The biology of the eosinophilic leukocyte. *Annu Rev Med* 1993; 44:85-101.
- (411) Tepper RI, Pattengale PK, Leder P. Murine interleukin-4 displays potent anti-tumor activity in vivo. *Cell* 1989; 57(3):503-512.
- (412) Tepper RI, Coffman RL, Leder P. An eosinophil-dependent mechanism for the antitumor effect of interleukin-4. *Science* 1992; 257(5069):548-551.
- (413) Yu JS, Wei MX, Chiocca EA, Martuza RL, Tepper RI. Treatment of glioma by engineered interleukin 4-secreting cells. *Cancer Res* 1993; 53(13):3125-3128.
- (414) Curran CS, Evans MD, Bertics PJ. GM-CSF production by glioblastoma cells has a functional role in eosinophil survival, activation, and growth factor production for enhanced tumor cell proliferation. *J Immunol* 2011; 187(3):1254-1263.
- (415) Yang D, Chen Q, Su SB et al. Eosinophil-derived neurotoxin acts as an alarmin to activate the TLR2-MyD88 signal pathway in dendritic cells and enhances Th2 immune responses. *J Exp Med* 2008; 205(1):79-90.
- (416) Horiuchi T, Weller PF. Expression of vascular endothelial growth factor by human eosinophils: upregulation by granulocyte macrophage colony-stimulating factor and interleukin-5. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 17(1):70-77.
- (417) Fossati G, Ricevuti G, Edwards SW, Walker C, Dalton A, Rossi ML. Neutrophil infiltration into human gliomas. *Acta Neuropathol* 1999; 98(4):349-354.

- (418) Iwatsuki K, Kumara E, Yoshimine T, Nakagawa H, Sato M, Hayakawa T. Elastase expression by infiltrating neutrophils in gliomas. *Neurol Res* 2000; 22(5):465-468.
- (419) Jensen TO, Schmidt H, Moller HJ et al. Intratumoral neutrophils and plasmacytoid dendritic cells indicate poor prognosis and are associated with pSTAT3 expression in AJCC stage I/II melanoma. *Cancer* 2012; 118(9):2476-2485.
- (420) Tazzyman S, Barry ST, Ashton S et al. Inhibition of neutrophil infiltration into A549 lung tumors in vitro and in vivo using a CXCR2-specific antagonist is associated with reduced tumor growth. *Int J Cancer* 2011; 129(4):847-858.
- (421) Rao HL, Chen JW, Li M et al. Increased intratumoral neutrophil in colorectal carcinomas correlates closely with malignant phenotype and predicts patients' adverse prognosis. *PLoS One* 2012; 7(1):e30806.
- (422) Zhao JJ, Pan K, Wang W et al. The prognostic value of tumor-infiltrating neutrophils in gastric adenocarcinoma after resection. *PLoS One* 2012; 7(3):e33655.
- (423) Bellocq A, Antoine M, Flahault A et al. Neutrophil alveolitis in bronchioloalveolar carcinoma: induction by tumor-derived interleukin-8 and relation to clinical outcome. *Am J Pathol* 1998; 152(1):83-92.
- (424) Kast RE, Scheuerle A, Wirtz CR, Karpel-Massler G, Halatsch ME. The rationale of targeting neutrophils with dapsone during glioblastoma treatment. *Anticancer Agents Med Chem* 2011; 11(8):756-761.
- (425) Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(6):401-410.
- (426) Coussens LM, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the development of cancer. *Chem Biol* 1996; 3(11):895-904.
- (427) Clark RA, Klebanoff SJ. Neutrophil-mediated tumor cell cytotoxicity: role of the peroxidase system. *J Exp Med* 1975; 141(6):1442-1447.
- (428) Di Carlo E, Forni G, Lollini P, Colombo MP, Modesti A, Musiani P. The intriguing role of polymorphonuclear neutrophils in antitumor reactions. *Blood* 2001; 97(2):339-345.
- (429) Fridlender ZG, Albelda SM. Tumor-associated neutrophils: friend or foe? *Carcinogenesis* 2012; 33(5):949-955.
- (430) Lapidot T, Sirard C, Vormoor J et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 1994; 367(6464):645-648.
- (431) Singh SK, Clarke ID, Hide T, Dirks PB. Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene* 2004; 23(43):7267-7273.
- (432) Bao S, Wu Q, Li Z et al. Targeting cancer stem cells through L1CAM suppresses glioma growth. *Cancer Res* 2008; 68(15):6043-6048.

- (433) Lathia JD, Gallagher J, Heddlestone JM et al. Integrin alpha 6 regulates glioblastoma stem cells. *Cell Stem Cell* 2010; 6(5):421-432.
- (434) Dubois C, Manuguerra JC, Hauteceur B, Maze J. Monoclonal antibody A2B5, which detects cell surface antigens, binds to ganglioside GT3 (II3 (NeuAc)3LacCer) and to its 9-O-acetylated derivative. *J Biol Chem* 1990; 265(5):2797-2803.
- (435) Ogden AT, Waziri AE, Lochhead RA et al. Identification of A2B5+C. *Neurosurgery* 2008; 62(2):505-514.
- (436) Abdouh M, Facchino S, Chatoo W, Balasingam V, Ferreira J, Bernier G. BMI1 sustains human glioblastoma multiforme stem cell renewal. *J Neurosci* 2009; 29(28):8884-8896.
- (437) Bao S, Wu Q, Sathornsumetee S et al. Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor. *Cancer Res* 2006; 66(16):7843-7848.
- (438) Gangemi RM, Griffiro F, Marubbi D et al. SOX2 silencing in glioblastoma tumor-initiating cells causes stop of proliferation and loss of tumorigenicity. *Stem Cells* 2009; 27(1):40-48.
- (439) Godlewski J, Nowicki MO, Bronisz A et al. Targeting of the Bmi-1 oncogene/stem cell renewal factor by microRNA-128 inhibits glioma proliferation and self-renewal. *Cancer Res* 2008; 68(22):9125-9130.
- (440) Hemmati HD, Nakano I, Lazareff JA et al. Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(25):15178-15183.
- (441) Ligon KL, Huillard E, Mehta S et al. Olig2-regulated lineage-restricted pathway controls replication competence in neural stem cells and malignant glioma. *Neuron* 2007; 53(4):503-517.
- (442) Woodward WA, Sulman EP. Cancer stem cells: markers or biomarkers? *Cancer Metastasis Rev* 2008; 27(3):459-470.
- (443) Ikushima H, Todo T, Ino Y, Takahashi M, Miyazawa K, Miyazono K. Autocrine TGF-beta signaling maintains tumorigenicity of glioma-initiating cells through Sry-related HMG-box factors. *Cell Stem Cell* 2009; 5(5):504-514.
- (444) Penuelas S, Anido J, Prieto-Sanchez RM et al. TGF-beta increases glioma-initiating cell self-renewal through the induction of LIF in human glioblastoma. *Cancer Cell* 2009; 15(4):315-327.
- (445) Beier D, Hau P, Proescholdt M et al. CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res* 2007; 67(9):4010-4015.
- (446) Wang J, Sakariassen PO, Tsinkalovsky O et al. CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells. *Int J Cancer* 2008; 122(4):761-768.

- (447) Liu G, Yuan X, Zeng Z et al. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer* 2006; 5:67.
- (448) Pallini R, Ricci-Vitiani L, Banna GL et al. Cancer stem cell analysis and clinical outcome in patients with glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res* 2008; 14(24):8205-8212.
- (449) Zeppernick F, Ahmadi R, Campos B et al. Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients. *Clin Cancer Res* 2008; 14(1):123-129.
- (450) Wang R, Chadalavada K, Wilshire J et al. Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. *Nature* 2010; 468(7325):829-833.
- (451) Eyler CE, Foo WC, LaFiura KM, McLendon RE, Hjelmeland AB, Rich JN. Brain cancer stem cells display preferential sensitivity to Akt inhibition. *Stem Cells* 2008; 26(12):3027-3036.
- (452) Molina JR, Hayashi Y, Stephens C, Georgescu MM. Invasive glioblastoma cells acquire stemness and increased Akt activation. *Neoplasia* 2010; 12(6):453-463.
- (453) Oka N, Soeda A, Inagaki A et al. VEGF promotes tumorigenesis and angiogenesis of human glioblastoma stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 360(3):553-559.
- (454) Charles N, Holland EC. The perivascular niche microenvironment in brain tumor progression. *Cell Cycle* 2010; 9(15):3012-3021.
- (455) Moore KA, Lemischka IR. Stem cells and their niches. *Science* 2006; 311(5769):1880-1885.
- (456) Calabrese C, Poppleton H, Kocak M et al. A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell* 2007; 11(1):69-82.
- (457) Chen J, Li Y, Yu TS et al. A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature* 2012; 488(7412):522-526.
- (458) Evans SM, Jenkins KW, Chen HI et al. The Relationship among Hypoxia, Proliferation, and Outcome in Patients with De Novo Glioblastoma: A Pilot Study. *Transl Oncol* 2010; 3(3):160-169.
- (459) Heddleston JM, Li Z, McLendon RE, Hjelmeland AB, Rich JN. The hypoxic microenvironment maintains glioblastoma stem cells and promotes reprogramming towards a cancer stem cell phenotype. *Cell Cycle* 2009; 8(20):3274-3284.
- (460) Li Z, Bao S, Wu Q et al. Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells. *Cancer Cell* 2009; 15(6):501-513.
- (461) Seidel S, Garvalov BK, Wirta V et al. A hypoxic niche regulates glioblastoma stem cells through hypoxia inducible factor 2 alpha. *Brain* 2010; 133(Pt 4):983-995.

- (462) Soeda A, Park M, Lee D et al. Hypoxia promotes expansion of the CD133-positive glioma stem cells through activation of HIF-1alpha. *Oncogene* 2009; 28(45):3949-3959.
- (463) Cheng L, Wu Q, Guryanova OA et al. Elevated invasive potential of glioblastoma stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 406(4):643-648.
- (464) Di Tomaso T, Mazzoleni S, Wang E et al. Immunobiological characterization of cancer stem cells isolated from glioblastoma patients. *Clin Cancer Res* 2010; 16(3):800-813.
- (465) Wei J, Barr J, Kong LY et al. Glioma-associated cancer-initiating cells induce immunosuppression. *Clin Cancer Res* 2010; 16(2):461-473.
- (466) Wei J, Barr J, Kong LY et al. Glioblastoma cancer-initiating cells inhibit T-cell proliferation and effector responses by the signal transducers and activators of transcription 3 pathway. *Mol Cancer Ther* 2010; 9(1):67-78.
- (467) Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD, Cunha GR. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res* 1999; 59(19):5002-5011.
- (468) Ronnov-Jessen L, Petersen OW, Bissell MJ. Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: importance of the stromal reaction. *Physiol Rev* 1996; 76(1):69-125.
- (469) Schor SL, Schor AM, Rushton G. Fibroblasts from cancer patients display a mixture of both foetal and adult-like phenotypic characteristics. *J Cell Sci* 1988; 90 (Pt 3):401-407.
- (470) Tlsty TD, Coussens LM. Tumor stroma and regulation of cancer development. *Annu Rev Pathol* 2006; 1:119-150.
- (471) Gonda TA, Varro A, Wang TC, Tycko B. Molecular biology of cancer-associated fibroblasts: can these cells be targeted in anti-cancer therapy? *Semin Cell Dev Biol* 2010; 21(1):2-10.
- (472) Paunescu V, Bojin FM, Tatu CA et al. Tumour-associated fibroblasts and mesenchymal stem cells: more similarities than differences. *J Cell Mol Med* 2011; 15(3):635-646.
- (473) Clavreul A, Etcheverry A, Chassevent A et al. Isolation of a new cell population in the glioblastoma microenvironment. *J Neurooncol* 2012; 106(3):493-504.
- (474) Naumov GN, Bender E, Zurakowski D et al. A model of human tumor dormancy: an angiogenic switch from the nonangiogenic phenotype. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98(5):316-325.
- (475) Xian X, Hakansson J, Stahlberg A et al. Pericytes limit tumor cell metastasis. *J Clin Invest* 2006; 116(3):642-651.

- (476) Yonenaga Y, Mori A, Onodera H et al. Absence of smooth muscle actin-positive pericyte coverage of tumor vessels correlates with hematogenous metastasis and prognosis of colorectal cancer patients. *Oncology* 2005; 69(2):159-166.
- (477) Cancilla PA, Baker RN, Pollock PS, Frommes SP. The reaction of pericytes of the central nervous system to exogenous protein. *Lab Invest* 1972; 26(4):376-383.
- (478) Thomas WE. Brain macrophages: on the role of pericytes and perivascular cells. *Brain Res Brain Res Rev* 1999; 31(1):42-57.
- (479) Charles NA, Holland EC, Gilbertson R, Glass R, Kettenmann H. The brain tumor microenvironment. *Glia* 2011; 59(8):1169-1180.
- (480) Ahmed N, Salsman VS, Kew Y et al. HER2-specific T cells target primary glioblastoma stem cells and induce regression of autologous experimental tumors. *Clin Cancer Res* 2010; 16(2):474-485.
- (481) Avril T, Vauleon E, Hamlat A et al. Human Glioblastoma Stem-Like Cells are More Sensitive to Allogeneic NK and T Cell-Mediated Killing Compared with Serum-Cultured Glioblastoma Cells. *Brain Pathol* 2012; 22(2):159-174.
- (482) Brown CE, Starr R, Martinez C et al. Recognition and killing of brain tumor stem-like initiating cells by CD8+ cytolytic T cells. *Cancer Res* 2009; 69(23):8886-8893.
- (483) Thomas AA, Ernstoff MS, Fadul CE. Immunotherapy for the treatment of glioblastoma. *Cancer J* 2012; 18(1):59-68.
- (484) Avril T, Vauleon E, Tanguy-Royer S, Mosser J, Quillien V. Mechanisms of immunomodulation in human glioblastoma. *Immunotherapy* 2011; 3(4 Suppl):42-44.
- (485) Avril T, Saikali S, Vauleon E et al. Distinct effects of human glioblastoma immunoregulatory molecules programmed cell death ligand-1 (PDL-1) and indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) on tumour-specific T cell functions. *J Neuroimmunol* 2010; 225(1-2):22-23.
- (486) Sun L, Hui AM, Su Q et al. Neuronal and glioma-derived stem cell factor induces angiogenesis within the brain. *Cancer Cell* 2006; 9(4):287-300.
- (487) Petalidis LP, Oulas A, Backlund M et al. Improved grading and survival prediction of human astrocytic brain tumors by artificial neural network analysis of gene expression microarray data. *Mol Cancer Ther* 2008; 7(5):1013-1024.
- (488) Zhang B, Horvath S. A general framework for weighted gene co-expression network analysis. *Stat Appl Genet Mol Biol* 2005; 4(1):Article17.
- (489) Langfelder P, Zhang B, Horvath S. Defining clusters from a hierarchical cluster tree: the Dynamic Tree Cut package for R. *Bioinformatics* 2008; 24(5):719-720.
- (490) Horvath S, Dong J. Geometric interpretation of gene coexpression network analysis. *PLoS Comput Biol* 2008; 4(8):e1000117-doi:10.1371/journal.pcbi.1000117.

- (491) Cox DR. Regression models and life-tables. *Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological)* 1972; 34(2):187-220.
- (492) Graeber MB, Scheithauer BW, Kreutzberg GW. Microglia in brain tumors. *Glia* 2002; 40(2):252-259.
- (493) Suzuki K, Kobayashi T, Funatsu O, Morita A, Ikekita M. Activin A induces neuronal differentiation and survival via ALK4 in a SMAD-independent manner in a subpopulation of human neuroblastomas. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 394(3):639-645.
- (494) Abdipranoto-Cowley A, Park JS, Croucher D et al. Activin A is essential for neurogenesis following neurodegeneration. *Stem Cells* 2009; 27(6):1330-1346.
- (495) Trudeau VL, Theodosis DT, Poulain DA. Activin facilitates neuronal development in the rat amygdala. *Neurosci Lett* 1997; 237(1):33-36.
- (496) Wu DD, Lai M, Hughes PE, Sirimanne E, Gluckman PD, Williams CE. Expression of the activin axis and neuronal rescue effects of recombinant activin A following hypoxic-ischemic brain injury in the infant rat. *Brain Res* 1999; 835(2):369-378.
- (497) Simon DP, Vadakkadath MS, Wilson AC et al. Activin receptor signaling regulates prostatic epithelial cell adhesion and viability. *Neoplasia* 2009; 11(4):365-376.
- (498) Xiao L, Yuan X, Sharkis SJ. Activin A maintains self-renewal and regulates fibroblast growth factor, Wnt, and bone morphogenic protein pathways in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2006; 24(6):1476-1486.
- (499) Jung B, Gomez J, Chau E et al. Activin signaling in microsatellite stable colon cancers is disrupted by a combination of genetic and epigenetic mechanisms. *PLoS One* 2009; 4(12):e8308.
- (500) Tougeron D, Fauquembergue E, Rouquette A et al. Tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal cancers with microsatellite instability are correlated with the number and spectrum of frameshift mutations. *Mod Pathol* 2009; 22(9):1186-1195.
- (501) Morris SMJr. Recent advances in arginine metabolism: roles and regulation of the arginases. *Br J Pharmacol* 2009; 157(6):922-930.
- (502) Estevez AG, Sahawneh MA, Lange PS, Bae N, Egea M, Ratan RR. Arginase 1 regulation of nitric oxide production is key to survival of trophic factor-deprived motor neurons. *J Neurosci* 2006; 26(33):8512-8516.
- (503) Kondoh T, Kameishi M, Mallick HN, Ono T, Torii K. Lysine and arginine reduce the effects of cerebral ischemic insults and inhibit glutamate-induced neuronal activity in rats. *Front Integr Neurosci* 2010; 4:18.
- (504) Yachimovich-Cohen N, Even-Ram S, Shufaro Y, Rachmilewitz J, Reubinoff B. Human embryonic stem cells suppress T cell responses via arginase I-dependent mechanism. *J Immunol* 2010; 184(3):1300-1308.

- (505) Bansal V, Ochoa JB. Arginine availability, arginase, and the immune response. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2003; 6(2):223-228.
- (506) Sippel TR, White J, Nag K et al. Neutrophil degranulation and immunosuppression in patients with GBM: restoration of cellular immune function by targeting arginase I. *Clin Cancer Res* 2011; 17(22):6992-7002.
- (507) Highfill SL, Rodriguez PC, Zhou Q et al. Bone marrow myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) inhibit graft-versus-host disease (GVHD) via an arginase-1-dependent mechanism that is up-regulated by interleukin-13. *Blood* 2010; 116(25):5738-5747.
- (508) Rodriguez PC, Zea AH, Culotta KS, Zabaleta J, Ochoa JB, Ochoa AC. Regulation of T cell receptor CD3zeta chain expression by L-arginine. *J Biol Chem* 2002; 277(24):21123-21129.
- (509) Rodriguez PC, Quiceno DG, Zabaleta J et al. Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses. *Cancer Res* 2004; 64(16):5839-5849.
- (510) Rodriguez PC, Quiceno DG, Ochoa AC. L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression. *Blood* 2007; 109(4):1568-1573.
- (511) Woo EY, Yeh H, Chu CS et al. Cutting edge: Regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation. *J Immunol* 2002; 168(9):4272-4276.
- (512) Liu CY, Wang YM, Wang CL et al. Population alterations of L-arginase- and inducible nitric oxide synthase-expressed CD11b+/CD14(-)/CD15+/CD33+ myeloid-derived suppressor cells and CD8+ T lymphocytes in patients with advanced-stage non-small cell lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010; 136(1):35-45.
- (513) Tedder TF, Tuscano J, Sato S, Kehrl JH. CD22, a B lymphocyte-specific adhesion molecule that regulates antigen receptor signaling. *Annu Rev Immunol* 1997; 15:481-504.
- (514) Wilson GL, Fox CH, Fauci AS, Kehrl JH. cDNA cloning of the B cell membrane protein CD22: a mediator of B-B cell interactions. *J Exp Med* 1991; 173(1):137-146.
- (515) Jin L, McLean PA, Neel BG, Wortis HH. Sialic acid binding domains of CD22 are required for negative regulation of B cell receptor signaling. *J Exp Med* 2002; 195(9):1199-1205.
- (516) Mott RT, it-Ghezala G, Town T et al. Neuronal expression of CD22: novel mechanism for inhibiting microglial proinflammatory cytokine production. *Glia* 2004; 46(4):369-379.
- (517) Loilome W, Joshi AD, ap Rhys CM et al. Glioblastoma cell growth is suppressed by disruption of Fibroblast Growth Factor pathway signaling. *J Neurooncol* 2009; 94(3):359-366.

- (518) Salmaggi A, Eoli M, Frigerio S et al. Intracavitary VEGF, bFGF, IL-8, IL-12 levels in primary and recurrent malignant glioma. *J Neurooncol* 2003; 62(3):297-303.
- (519) Morrison RS, Yamaguchi F, Saya H et al. Basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptor I are implicated in the growth of human astrocytomas. *J Neurooncol* 1994; 18(3):207-216.
- (520) Joy A, Moffett J, Neary K et al. Nuclear accumulation of FGF-2 is associated with proliferation of human astrocytes and glioma cells. *Oncogene* 1997; 14(2):171-183.
- (521) Renko M, Quarto N, Morimoto T, Rifkin DB. Nuclear and cytoplasmic localization of different basic fibroblast growth factor species. *J Cell Physiol* 1990; 144(1):108-114.
- (522) Cohen-Jonathan E, Toulas C, Monteil S et al. Radioresistance induced by the high molecular forms of the basic fibroblast growth factor is associated with an increased G2 delay and a hyperphosphorylation of p34CDC2 in HeLa cells. *Cancer Res* 1997; 57(7):1364-1370.
- (523) Lemiere S, Azar R, Belloc F et al. Overexpression of high molecular weight FGF-2 forms inhibits glioma growth by acting on cell-cycle progression and protein translation. *Exp Cell Res* 2008; 314(20):3701-3711.
- (524) Belloni E, Martucciello G, Verderio D et al. Involvement of the HLXB9 homeobox gene in Currarino syndrome. *Am J Hum Genet* 2000; 66(1):312-319.
- (525) Currarino G, Coln D, Votteler T. Triad of anorectal, sacral, and presacral anomalies. *AJR Am J Roentgenol* 1981; 137(2):395-398.
- (526) Harrison KA, Druey KM, Deguchi Y, Tuscano JM, Kehrl JH. A novel human homeobox gene distantly related to proboscipedia is expressed in lymphoid and pancreatic tissues. *J Biol Chem* 1994; 269(31):19968-19975.
- (527) Ferguson S, Gautrey HE, Strathdee G. The dual role of HLXB9 in leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2011; 56(3):349-352.
- (528) Hollington P, Neufing P, Kalionis B et al. Expression and localization of homeodomain proteins DLX4, HB9 and HB24 in malignant and benign human colorectal tissues. *Anticancer Res* 2004; 24(2B):955-962.
- (529) Wilkens L, Jaggi R, Hammer C, Inderbitzin D, Giger O, von NN. The homeobox gene HLXB9 is upregulated in a morphological subset of poorly differentiated hepatocellular carcinoma. *Virchows Arch* 2011; 458(6):697-708.
- (530) Brejot T, Blanchard S, Hocquemiller M et al. Forced expression of the motor neuron determinant HB9 in neural stem cells affects neurogenesis. *Exp Neurol* 2006; 198(1):167-182.
- (531) Morimoto K, Lin S, Sakamoto K. The functions of RPS19 and their relationship to Diamond-Blackfan anemia: a review. *Mol Genet Metab* 2007; 90(4):358-362.

- (532) Willig TN, Gazda H, Sieff CA. Diamond-Blackfan anemia. *Curr Opin Hematol* 2000; 7(2):85-94.
- (533) Draptchinskaia N, Gustavsson P, Andersson B et al. The gene encoding ribosomal protein S19 is mutated in Diamond-Blackfan anaemia. *Nat Genet* 1999; 21(2):169-175.
- (534) Sturm I, Kohne CH, Wolff G et al. Analysis of the p53/BAX pathway in colorectal cancer: low BAX is a negative prognostic factor in patients with resected liver metastases. *J Clin Oncol* 1999; 17(5):1364-1374.
- (535) Yamamoto T, Nishiura H, Nishida H. Molecular mechanisms to form leukocyte infiltration patterns distinct between synovial tissue and fluid of rheumatoid arthritis. *Semin Thromb Hemost* 1996; 22(6):507-511.
- (536) Yamamoto T. Molecular mechanism of monocyte predominant infiltration in chronic inflammation: mediation by a novel monocyte chemotactic factor, S19 ribosomal protein dimer. *Pathol Int* 2000; 50(11):863-871.
- (537) Nishiura H, Shibuya Y, Yamamoto T. S19 ribosomal protein cross-linked dimer causes monocyte-predominant infiltration by means of molecular mimicry to complement C5a. *Lab Invest* 1998; 78(12):1615-1623.
- (538) Chien CC, Tu TC, Huang CJ, Yang SH, Lee CL. Lowly expressed ribosomal protein s19 in the feces of patients with colorectal cancer. *ISRN Gastroenterol* 2012; 2012:394545.
- (539) Poole TJ, Finkelstein EB, Cox CM. The role of FGF and VEGF in angioblast induction and migration during vascular development. *Dev Dyn* 2001; 220(1):1-17.
- (540) Soulet F, Al ST, Roga S, Amalric F, Bouche G. Fibroblast growth factor-2 interacts with free ribosomal protein S19. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 289(2):591-596.
- (541) Yoshimura S, Takagi Y, Harada J et al. FGF-2 regulation of neurogenesis in adult hippocampus after brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(10):5874-5879.
- (542) Silber J, Jacobsen A, Ozawa T et al. miR-34a repression in proneural malignant gliomas upregulates expression of its target PDGFRA and promotes tumorigenesis. *PLoS One* 2012; 7(3):e33844.
- (543) Wheeler CJ, Das A, Liu G, Yu JS, Black KL. Clinical responsiveness of glioblastoma multiforme to chemotherapy after vaccination. *Clin Cancer Res* 2004; 10(16):5316-5326.
- (544) Vauleon E, Tony A, Hamlat A et al. Immune genes are associated with human glioblastoma pathology and patient survival. *BMC Med Genomics* 2012; 5(1):41.
- (545) Morris CS, Esiri MM. Immunocytochemical study of macrophages and microglial cells and extracellular matrix components in human CNS disease. 1. Gliomas. *J Neurol Sci* 1991; 101(1):47-58.

- (546) Senger DR, Van de WL, Brown LF et al. Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. *Cancer Metastasis Rev* 1993; 12(3-4):303-324.
- (547) Nishie M, Mori F, Houzen H, Yamaguchi J, Jensen PH, Wakabayashi K. Oligodendrocytes within astrocytes ("emperipolesis") in the cerebral white matter in hepatic and hypoglycemic encephalopathy. *Neuropathology* 2006; 26(1):62-65.
- (548) Ito D, Imai Y, Ohsawa K, Nakajima K, Fukuuchi Y, Kohsaka S. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Brain Res Mol Brain Res* 1998; 57(1):1-9.
- (549) Imai Y, Iyata I, Ito D, Ohsawa K, Kohsaka S. A novel gene iba1 in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 224(3):855-862.
- (550) Ohsawa K, Imai Y, Nakajima K, Kohsaka S. Generation and characterization of a microglial cell line, MG5, derived from a p53-deficient mouse. *Glia* 1997; 21(3):285-298.
- (551) Perry VH, Gordon S. Macrophages and microglia in the nervous system. *Trends Neurosci* 1988; 11(6):273-277.
- (552) Becker S, Daniel EG. Antagonistic and additive effects of IL-4 and interferon-gamma on human monocytes and macrophages: effects on Fc receptors, HLA-D antigens, and superoxide production. *Cell Immunol* 1990; 129(2):351-362.
- (553) de Waal Malefyt R, Figdor CG, Huijbens R et al. Effects of IL-13 on phenotype, cytokine production, and cytotoxic function of human monocytes. Comparison with IL-4 and modulation by IFN-gamma or IL-10. *J Immunol* 1993; 151(11):6370-6381.
- (554) Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C et al. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* 2001; 409(6817):198-201.
- (555) Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 2004; 25(12):677-686.
- (556) Ransohoff RM, Perry VH. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol* 2009; 27:119-145.
- (557) Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer* 2006; 42(6):717-727.
- (558) Bingle L, Brown NJ, Lewis CE. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol* 2002; 196(3):254-265.
- (559) Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 2010; 141(1):39-51.

- (560) Jacobs VL, Landry RP, Liu Y, Romero-Sandoval EA, De Leo JA. Propentofylline decreases tumor growth in a rodent model of glioblastoma multiforme by a direct mechanism on microglia. *Neuro Oncol* 2012; 14(2):119-131.
- (561) Magnus T, Schreiner B, Korn T et al. Microglial expression of the B7 family member B7 homolog 1 confers strong immune inhibition: implications for immune responses and autoimmunity in the CNS. *J Neurosci* 2005; 25(10):2537-2546.
- (562) Guillemin GJ, Smythe G, Takikawa O, Brew BJ. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase and production of quinolinic acid by human microglia, astrocytes, and neurons. *Glia* 2005; 49(1):15-23.
- (563) Kren L, Muckova K, Lzicarova E et al. Production of immune-modulatory nonclassical molecules HLA-G and HLA-E by tumor infiltrating ameboid microglia/macrophages in glioblastomas: a role in innate immunity? *J Neuroimmunol* 2010; 220(1-2):131-135.
- (564) Xu Q, Akama R, Isaji T et al. Wnt/beta-catenin signaling down-regulates N-acetylglucosaminyltransferase III expression: the implications of two mutually exclusive pathways for regulation. *J Biol Chem* 2011; 286(6):4310-4318.
- (565) Ye XZ, Xu SL, Xin YH et al. Tumor-associated microglia/macrophages enhance the invasion of glioma stem-like cells via TGF-beta1 signaling pathway. *J Immunol* 2012; 189(1):444-453.
- (566) Waziri A, Killory B, Ogden AT, III et al. Preferential in situ CD4+CD56+ T cell activation and expansion within human glioblastoma. *J Immunol* 2008; 180(11):7673-7680.
- (567) Heimberger AB, bou-Ghazal M, Reina-Ortiz C et al. Incidence and prognostic impact of FoxP3+ regulatory T cells in human gliomas. *Clin Cancer Res* 2008; 14(16):5166-5172.
- (568) Hinz S, Pagerols-Raluy L, Oberg HH et al. Foxp3 expression in pancreatic carcinoma cells as a novel mechanism of immune evasion in cancer. *Cancer Res* 2007; 67(17):8344-8350.
- (569) Ebert LM, Tan BS, Browning J et al. The regulatory T cell-associated transcription factor FoxP3 is expressed by tumor cells. *Cancer Res* 2008; 68(8):3001-3009.
- (570) Ladoire S, Arnould L, Mignot G et al. Presence of Foxp3 expression in tumor cells predicts better survival in HER2-overexpressing breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat* 2011; 125(1):65-72.
- (571) Merlo A, Casalini P, Carcangiu ML et al. FOXP3 expression and overall survival in breast cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27(11):1746-1752.
- (572) Wang WH, Jiang CL, Yan W et al. FOXP3 expression and clinical characteristics of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2010; 16(43):5502-5509.
- (573) Winerdal ME, Marits P, Winerdal M et al. FOXP3 and survival in urinary bladder cancer. *BJU Int* 2011; 108(10):1672-1678.

- (574) Tao H, Mimura Y, Aoe K et al. Prognostic potential of FOXP3 expression in non-small cell lung cancer cells combined with tumor-infiltrating regulatory T cells. *Lung Cancer* 2012; 75(1):95-101.
- (575) Kim M, Grimmig T, Grimm M et al. Expression of Foxp3 in colorectal cancer but not in Treg cells correlates with disease progression in patients with colorectal cancer. *PLoS One* 2013; 8(1):e53630.
- (576) Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4(4):330-336.
- (577) Fontenot JD, Rudensky AY. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat Immunol* 2005; 6(4):331-337.
- (578) Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol* 2010; 10(7):490-500.
- (579) Onizuka S, Tawara I, Shimizu J, Sakaguchi S, Fujita T, Nakayama E. Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res* 1999; 59(13):3128-3133.
- (580) Shimizu J, Yamazaki S, Sakaguchi S. Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol* 1999; 163(10):5211-5218.
- (581) Groux H, O'Garra A, Bigler M et al. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997; 389(6652):737-742.
- (582) Weiner HL. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev* 2001; 182:207-214.
- (583) Jordan JT, Sun W, Hussain SF, DeAngulo G, Prabhu SS, Heimberger AB. Preferential migration of regulatory T cells mediated by glioma-secreted chemokines can be blocked with chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2008; 57(1):123-131.
- (584) Learn CA, Fecci PE, Schmittling RJ et al. Profiling of CD4+, CD8+, and CD4+CD25+CD45RO+FoxP3+ T cells in patients with malignant glioma reveals differential expression of the immunologic transcriptome compared with T cells from healthy volunteers. *Clin Cancer Res* 2006; 12(24):7306-7315.
- (585) Yang I, Tihan T, Han SJ et al. CD8+ T-cell infiltrate in newly diagnosed glioblastoma is associated with long-term survival. *J Clin Neurosci* 2010; 17(11):1381-1385.
- (586) Bergers G, Brekken R, McMahon G et al. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* 2000; 2(10):737-744.
- (587) Nozawa H, Chiu C, Hanahan D. Infiltrating neutrophils mediate the initial angiogenic switch in a mouse model of multistage carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(33):12493-12498.

- (588) Tazzyman S, Lewis CE, Murdoch C. Neutrophils: key mediators of tumour angiogenesis. *Int J Exp Pathol* 2009; 90(3):222-231.
- (589) Lee LF, Hellendall RP, Wang Y et al. IL-8 reduced tumorigenicity of human ovarian cancer in vivo due to neutrophil infiltration. *J Immunol* 2000; 164(5):2769-2775.
- (590) Wang J, Huang M, Lee P et al. Interleukin-8 inhibits non-small cell lung cancer proliferation: a possible role for regulation of tumor growth by autocrine and paracrine pathways. *J Interferon Cytokine Res* 1996; 16(1):53-60.
- (591) Baggiolini M, Walz A, Kunkel SL. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest* 1989; 84(4):1045-1049.
- (592) de I, I, Konopka G, Lim KL et al. Deregulation of a STAT3-interleukin 8 signaling pathway promotes human glioblastoma cell proliferation and invasiveness. *J Neurosci* 2008; 28(23):5870-5878.
- (593) Hor WS, Huang WL, Lin YS, Yang BC. Cross-talk between tumor cells and neutrophils through the Fas (APO-1, CD95)/FasL system: human glioma cells enhance cell viability and stimulate cytokine production in neutrophils. *J Leukoc Biol* 2003; 73(3):363-368.
- (594) Badie B, Schartner JM, Paul J, Bartley BA, Vorpahl J, Preston JK. Dexamethasone-induced abolition of the inflammatory response in an experimental glioma model: a flow cytometry study. *J Neurosurg* 2000; 93(4):634-639.

7. ANNEXES

7.1. liste de 791 gènes immuns

	Gene Name	UniGene ID	Gene ID	Description
1	ABCC9	Hs.446050	10060	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 9
2	ACE	Hs.654434	1636	Angiotensin I converting enzyme (peptidyl-dipeptidase A) 1
3	ACVR1B	Hs.438918	91	Activin A receptor, type IB
4	ACVR2A	Hs.470174	92	Activin A receptor, type IIA
5	ADA	Hs.654536	100	Adenosine deaminase
6	ADAM10	Hs.578508	102	ADAM metalloproteinase domain 10
7	ADAM17	Hs.404914	6868	ADAM metalloproteinase domain 17 (tumor necrosis factor, alpha, converting enzyme)
8	ADAM19	Hs.483944	8728	ADAM metalloproteinase domain 19 (meltrin beta)
9	ADAM9	Hs.591852	8754	ADAM metalloproteinase domain 9 (meltrin gamma)
10	ADAMDEC1	Hs.521459	27299	ADAM-like, decysin 1
11	ADIPOQ	Hs.80485	9370	Adiponectin, C1Q and collagen domain containing
12	ADSS	Hs.498313	159	Adenylosuccinate synthase
13	AICDA	Hs.149342	57379	Activation-induced cytidine deaminase
14	AIM2	Hs.281898	9447	Absent in melanoma 2
15	AIMP1	Hs.591680	9255	Aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 1
16	AKAP17A	Hs.522572	8227	A-kinase anchor protein 17A
17	AKT1	Hs.525622	207	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
18	ALAS2	Hs.522666	212	Aminolevullinate, delta-, synthase 2 (sideroblastic/hypochromic anemia)
19	AMBP	Hs.436911	259	Alpha-1-microglobulin/bikunin precursor
20	ANXA11	Hs.530291	311	Annexin A11
21	AP2A2	Hs.19121	161	Adaptor-related protein complex 2, alpha 2 subunit
22	AP2B1	Hs.514819	163	Adaptor-related protein complex 2, beta 1 subunit
23	AP2M1	Hs.518460	1173	Adaptor-related protein complex 2, mu 1 subunit
24	AP2S1	Hs.119591	1175	Adaptor-related protein complex 2, sigma 1 subunit
25	APOA1	Hs.633003	335	Apolipoprotein A-I
26	APOA2	Hs.237658	336	Apolipoprotein A-II
27	APOA4	Hs.591940	337	Apolipoprotein A-IV
28	APOBEC3F	Hs.659991	200316	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3F
29	APOBEC3G	Hs.660143	60489	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G
30	APOL1	Hs.114309	8542	Apolipoprotein L, 1
31	AQP3	Hs.234642	360	Aquaporin 3 (GIII blood group)
32	AQP9	Hs.104624	366	Aquaporin 9
33	ARG1	Hs.440934	383	Arginase, liver
34	ARG2	Hs.705408	384	Arginase, type II
35	ARHGDIB	Hs.504877	397	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta
36	ARNT	Hs.632446	405	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
37	ASH2L	Hs.521530	9070	Ash2 (absent, small, or homeotic)-like (Drosophila)
38	ATP6V0A2	Hs.201939	23545	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V0 subunit a2
39	ATP6V1H	Hs.491737	51606	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 50/57kDa, V1 subunit H
40	ATP7A	Hs.496414	538	ATPase, Cu ⁺⁺ transporting, alpha polypeptide (Menkes syndrome)
41	AZU1	Hs.72885	566	Azurocidin 1 (cationic antimicrobial protein 37)
42	B9D2	Hs.567596	80776	B9 protein domain 2
43	BCAP31	Hs.522817	10134	B-cell receptor-associated protein 31
44	BCL10	Hs.193516	8915	B-cell CLL/lymphoma 10
45	BCL11A	Hs.370549	53335	B-cell CLL/lymphoma 11A (zinc finger protein)
46	BCL2	Hs.150749	596	B-cell CLL/lymphoma 2
47	BCL6	Hs.478588	604	B-cell CLL/lymphoma 6 (zinc finger protein 51)
48	BGLAP	Hs.654541	632	Bone gamma-carboxyglutamate (gla) protein (osteocalcin)
49	BLNK	Hs.665244	29760	B-cell linker
50	BMP6	Hs.285671	654	Bone morphogenetic protein 6
51	BMPR1A	Hs.524477	657	Bone morphogenetic protein receptor, type IA
52	BNIP3	Hs.144873	664	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3
53	BNIP3L	Hs.131226	665	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like
54	BPI	Hs.529019	671	Bactericidal/permeability-increasing protein
55	BST1	Hs.169998	683	Bone marrow stromal cell antigen 1
56	BST2	Hs.118110	684	Bone marrow stromal cell antigen 2
57	C1QBP	Hs.555866	708	Complement component 1, q subcomponent binding protein

58	C2	Hs.408903	717	Complement component 2
59	C3	Hs.529053	718	Complement component 3
60	C5AR1	Hs.2161	728	Complement component 5a receptor 1
61	CADM1	Hs.370510	23705	Cell adhesion molecule 1
62	CALCA	Hs.37058	796	Calcitonin/calcitonin-related polypeptide, alpha
63	CALCOCO2	Hs.514920	10241	Calcium binding and coiled-coil domain 2
64	CALR	Hs.515162	811	Calreticulin
65	CARTPT	Hs.1707	9607	CART prepropeptide
66	CCBP2	Hs.146346	1238	Chemokine binding protein 2
67	CCL1	Hs.72918	6346	Chemokine (C-C motif) ligand 1
68	CCL11	Hs.54460	6356	Chemokine (C-C motif) ligand 11
69	CCL13	Hs.414629	6357	Chemokine (C-C motif) ligand 13
70	CCL16	Hs.10458	6360	Chemokine (C-C motif) ligand 16
71	CCL17	Hs.546294	6361	Chemokine (C-C motif) ligand 17
72	CCL18	Hs.143961	6362	Chemokine (C-C motif) ligand 18 (pulmonary and activation-regulated)
73	CCL19	Hs.50002	6363	Chemokine (C-C motif) ligand 19
74	CCL2	Hs.303649	6347	Chemokine (C-C motif) ligand 2
75	CCL20	Hs.75498	6364	Chemokine (C-C motif) ligand 20
76	CCL21	Hs.57907	6366	Chemokine (C-C motif) ligand 21
77	CCL22	Hs.534347	6367	Chemokine (C-C motif) ligand 22
78	CCL23	Hs.169191	6368	Chemokine (C-C motif) ligand 23
79	CCL24	Hs.247838	6369	Chemokine (C-C motif) ligand 24
80	CCL25	Hs.310511	6370	Chemokine (C-C motif) ligand 25
81	CCL27	Hs.459590	10850	Chemokine (C-C motif) ligand 27
82	CCL4	Hs.75703	6351	Chemokine (C-C motif) ligand 4
83	CCL5	Hs.514821	6352	Chemokine (C-C motif) ligand 5
84	CCL7	Hs.251526	6354	Chemokine (C-C motif) ligand 7
85	CCL8	Hs.699804	6355	Chemokine (C-C motif) ligand 8
86	CCR1	Hs.301921	1230	Chemokine (C-C motif) receptor 1
87	CCR10	Hs.703555	2826	Chemokine (C-C motif) receptor 10
88	CCR2	Hs.644637	1231	Chemokine (C-C motif) receptor 2
89	CCR3	Hs.506190	1232	Chemokine (C-C motif) receptor 3
90	CCR4	Hs.184926	1233	Chemokine (C-C motif) receptor 4
91	CCR5	Hs.450802	1234	Chemokine (C-C motif) receptor 5
92	CCR6	Hs.46468	1235	Chemokine (C-C motif) receptor 6
93	CCR7	Hs.370036	1236	Chemokine (C-C motif) receptor 7
94	CCR8	Hs.113222	1237	Chemokine (C-C motif) receptor 8
95	CCR9	Hs.225946	10803	Chemokine (C-C motif) receptor 9
96	CCRL1	Hs.310512	51554	Chemokine (C-C motif) receptor-like 1
97	CCRL2	Hs.535713	9034	Chemokine (C-C motif) receptor-like 2
98	CD14	Hs.163867	929	CD14 molecule
99	CD163	Hs.504641	9332	CD163 molecule
100	CD164	Hs.520313	8763	CD164 molecule, sialomucin
101	CD19	Hs.652262	930	CD19 molecule
102	CD1A	Hs.1309	909	CD1a molecule
103	CD1D	Hs.1799	912	CD1d molecule
104	CD1E	Hs.249217	913	CD1e molecule
105	CD2	Hs.523500	914	CD2 molecule
106	CD200	Hs.79015	4345	CD200 molecule
107	CD207	Hs.199731	50489	CD207 molecule, langerin
108	CD209	Hs.278694	30835	CD209 molecule
109	CD22	Hs.643440	933	CD22 molecule
110	CD226	Hs.660130	10666	CD226 molecule
111	CD24	Hs.644105	934	CD24 molecule
112	CD244	Hs.157872	51744	CD244 molecule, natural killer cell receptor 2B4
113	CD247	Hs.156445	919	CD247 molecule
114	CD27	Hs.355307	939	CD27 molecule
115	CD28	Hs.591629	940	CD28 molecule

116	CD302	Hs.130014	9936	CD302 molecule
117	CD320	Hs.558499	51293	CD320 molecule
118	CD33	Hs.83731	945	CD33 molecule
119	CD34	Hs.374990	947	CD34 molecule
120	CD3D	Hs.504048	915	CD3d molecule, delta (CD3-TCR complex)
121	CD3E	Hs.3003	916	CD3e molecule, epsilon (CD3-TCR complex)
122	CD3EAP	Hs.705916	10849	CD3e molecule, epsilon associated protein
123	CD3G	Hs.2259	917	CD3g molecule, gamma (CD3-TCR complex)
124	CD4	Hs.631659	920	CD4 molecule
125	CD40	Hs.472860	958	CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5
126	CD40LG	Hs.592244	959	CD40 ligand (TNF superfamily, member 5, hyper-IgM syndrome)
127	CD44	Hs.502328	960	CD44 molecule (Indian blood group)
128	CD47	Hs.446414	961	CD47 molecule
129	CD69	Hs.208854	969	CD69 molecule
130	CD7	Hs.36972	924	CD7 molecule
131	CD70	Hs.501497	970	CD70 molecule
132	CD74	Hs.436568	972	CD74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain
133	CD79A	Hs.631567	973	CD79a molecule, immunoglobulin-associated alpha
134	CD79B	Hs.89575	974	CD79b molecule, immunoglobulin-associated beta
135	CD83	Hs.654558	9308	CD83 molecule
136	CD86	Hs.171182	942	CD86 molecule
137	CD8A	Hs.85258	925	CD8a molecule
138	CD8B	Hs.405667	926	CD8b molecule
139	CD93	Hs.97199	22918	CD93 molecule
140	CD96	Hs.142023	10225	CD96 molecule
141	CD97	Hs.466039	976	CD97 molecule
142	CD99	Hs.654354	4267	CD99 molecule
143	CDC42	Hs.690198	998	Cell division cycle 42 (GTP binding protein, 25kDa)
144	CDH15	Hs.148090	1013	Cadherin 15, M-cadherin (myotubule)
145	CDK6	Hs.119882	1021	Cyclin-dependent kinase 6
146	CDKN2A	Hs.512599	1029	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)
147	CEACAM1	Hs.512682	634	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (biliary glycoprotein)
148	CEACAM8	Hs.41	1088	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 8
149	CEBPA	Hs.699463	1050	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha
150	CEBPB	Hs.517106	1051	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta
151	CEBPG	Hs.429666	1054	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), gamma
152	CFB	Hs.69771	629	Complement factor B
153	CFD	Hs.155597	1675	Complement factor D (adipsin)
154	CFHR5	Hs.282594	81494	Complement factor H-related 5
155	CFP	Hs.53155	5199	Complement factor properdin
156	CHD7	Hs.20395	55636	Chromodomain helicase DNA binding protein 7
157	CHIA	Hs.128814	27159	Chitinase, acidic
158	CHIT1	Hs.201688	1118	Chitinase 1 (chitotriosidase)
159	CHRNA4	Hs.10734	1137	Cholinergic receptor, nicotinic, alpha 4
160	CHRNA2	Hs.2306	1141	Cholinergic receptor, nicotinic, beta 2 (neuronal)
161	CHST4	Hs.251383	10164	Carbohydrate (N-acetylglucosamine 6-O) sulfotransferase 4
162	CHUK	Hs.198998	1147	Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase
163	CIITA	Hs.701991	4261	Class II, major histocompatibility complex, transactivator
164	CKLF	Hs.15159	51192	Chemokine-like factor
165	CLEC10A	Hs.54403	10462	C-type lectin domain family 10, member A
166	CLEC11A	Hs.512680	6320	C-type lectin domain family 11, member A
167	CLEC16A	Hs.35490	23274	C-type lectin domain family 16, member A
168	CLEC1A	Hs.29549	51267	C-type lectin domain family 1, member A
169	CLEC1B	Hs.409794	51266	C-type lectin domain family 1, member B
170	CLEC2B	Hs.85201	9976	C-type lectin domain family 2, member B
171	CLEC2D	Hs.268326	29121	C-type lectin domain family 2, member D
172	CLEC3B	Hs.476092	7123	C-type lectin domain family 3, member B
173	CLEC4A	Hs.504657	50856	C-type lectin domain family 4, member A

174	CLEC4E	Hs.236516	26253	C-type lectin domain family 4, member E
175	CLEC4M	Hs.421437	10332	C-type lectin domain family 4, member M
176	CLEC5A	Hs.446235	23601	C-type lectin domain family 5, member A
177	CLEC7A	Hs.143929	64581	C-type lectin domain family 7, member A
178	CLPTM1	Hs.444441	1209	Cleft lip and palate associated transmembrane protein 1
179	CMKLR1	Hs.506659	1240	Chemokine-like receptor 1
180	CMTM6	Hs.380627	54918	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 6
181	CNIH	Hs.294603	10175	Cornichon homolog (Drosophila)
182	CNR2	Hs.73037	1269	Cannabinoid receptor 2 (macrophage)
183	COL3A1	Hs.443625	1281	Collagen, type III, alpha 1 (Ehlers-Danlos syndrome type IV, autosomal dominant)
184	COL4A3BP	Hs.270437	10087	Collagen, type IV, alpha 3 (Goodpasture antigen) binding protein
185	COLEC12	Hs.464422	81035	Collectin sub-family member 12
186	CORO1A	Hs.415067	11151	Coronin, actin binding protein, 1A
187	CRHR1	Hs.417628	1394	Corticotropin releasing hormone receptor 1
188	CRISP3	Hs.404466	10321	Cysteine-rich secretory protein 3
189	CRP	Hs.76452	1401	C-reactive protein, pentraxin-related
190	CRTAM	Hs.159523	56253	Cytotoxic and regulatory T cell molecule
191	CSF1	Hs.591402	1435	Colony stimulating factor 1 (macrophage)
192	CSF1R	Hs.654394	1436	Colony stimulating factor 1 receptor, formerly McDonough feline sarcoma viral (v-fms) oncogene h
193	CSF2	Hs.1349	1437	Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)
194	CSF2RA	Hs.520937	1438	Colony stimulating factor 2 receptor, alpha, low-affinity (granulocyte-macrophage)
195	CSF2RB	Hs.592192	1439	Colony stimulating factor 2 receptor, beta, low-affinity (granulocyte-macrophage)
196	CSF3	Hs.2233	1440	Colony stimulating factor 3 (granulocyte)
197	CSF3R	Hs.524517	1441	Colony stimulating factor 3 receptor (granulocyte)
198	CST7	Hs.143212	8530	Cystatin F (leukocystatin)
199	CTLA4	Hs.247824	1493	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
200	CTSC	Hs.128065	1075	Cathepsin C
201	CTSE	Hs.701979	1510	Cathepsin E
202	CTSG	Hs.421724	1511	Cathepsin G
203	CTSS	Hs.181301	1520	Cathepsin S
204	CTSW	Hs.416848	1521	Cathepsin W
205	CX3CL1	Hs.531668	6376	Chemokine (C-X3-C motif) ligand 1
206	CX3CR1	Hs.78913	1524	Chemokine (C-X3-C motif) receptor 1
207	CXADR	Hs.705503	1525	Coxsackie virus and adenovirus receptor
208	CXCL10	Hs.632586	3627	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10
209	CXCL11	Hs.632592	6373	Chemokine (C-X-C motif) ligand 11
210	CXCL12	Hs.522891	6387	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (stromal cell-derived factor 1)
211	CXCL13	Hs.100431	10563	Chemokine (C-X-C motif) ligand 13 (B-cell chemoattractant)
212	CXCL14	Hs.483444	9547	Chemokine (C-X-C motif) ligand 14
213	CXCL2	Hs.590921	2920	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2
214	CXCL3	Hs.89690	2921	Chemokine (C-X-C motif) ligand 3
215	CXCL5	Hs.89714	6374	Chemokine (C-X-C motif) ligand 5
216	CXCL6	Hs.164021	6372	Chemokine (C-X-C motif) ligand 6 (granulocyte chemotactic protein 2)
217	CXCL9	Hs.77367	4283	Chemokine (C-X-C motif) ligand 9
218	CXCR1	Hs.194778	3577	Chemokine (C-X-C motif) receptor 1
219	CXCR2	Hs.846	3579	Chemokine (C-X-C motif) receptor 2
220	CXCR3	Hs.198252	2833	Chemokine (C-X-C motif) receptor 3
221	CXCR4	Hs.593413	7852	Chemokine (C-X-C motif) receptor 4
222	CXCR5	Hs.113916	643	Chemokine (C-X-C motif) receptor 5
223	CXCR6	Hs.34526	10663	Chemokine (C-X-C motif) receptor 6
224	CXCR7	Hs.471751	57007	Chemokine (C-X-C motif) receptor 7
225	CYBA	Hs.513803	1535	Cytochrome b-245, alpha polypeptide
226	CYBB	Hs.292356	1536	Cytochrome b-245, beta polypeptide (chronic granulomatous disease)
227	CYP11B1	Hs.184927	1584	Cytochrome P450, family 11, subfamily B, polypeptide 1
228	CYSLTR2	Hs.253706	57105	Cysteinyl leukotriene receptor 2
229	DCAF15	Hs.443636	90379	DDB1- and CUL4-associated factor 15
230	DDOST	Hs.523145	1650	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase
231	DEFB4A	Hs.740237	100289462	Defensin beta 4A

232	DHRS2	Hs.272499	10202	Dehydrogenase/reductase (SDR family) member 2
233	DMBT1	Hs.279611	1755	Deleted in malignant brain tumors 1
234	DOCK2	Hs.586174	1794	Dedicator of cytokinesis 2
235	DPP4	Hs.368912	1803	Dipeptidyl-peptidase 4 (CD26, adenosine deaminase complexing protein 2)
236	DPP8	Hs.591106	54878	Dipeptidyl-peptidase 8
237	DYRK3	Hs.164267	8444	Dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 3
238	EBI3	Hs.501452	10148	Epstein-Barr virus induced gene 3
239	EDA	Hs.105407	1896	Ectodysplasin A
240	EDA2R	Hs.302017	60401	Ectodysplasin A2 receptor
241	EDAR	Hs.171971	10913	Ectodysplasin A receptor
242	EDN1	Hs.511899	1906	Endothelin 1
243	EDN2	Hs.1407	1907	Endothelin 2
244	EDN3	Hs.1408	1908	Endothelin 3
245	EDNRB	Hs.82002	1910	Endothelin receptor type B
246	EGF	Hs.419815	1950	Epidermal growth factor (beta-urogastrone)
247	EGFR	Hs.488293	1956	Epidermal growth factor receptor (erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene homolog, avian)
248	ELF4	Hs.271940	2000	E74-like factor 4 (ets domain transcription factor)
249	EPHB6	Hs.380089	2051	EPH receptor B6
250	ERAP1	Hs.436186	51752	Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1
251	ERAP2	Hs.591249	64167	Endoplasmic reticulum aminopeptidase 2
252	ERBB2	Hs.446352	2064	V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene
253	ERBB3	Hs.118681	2065	V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 (avian)
254	ERBB4	Hs.390729	2066	V-erb-a erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4 (avian)
255	EREG	Hs.115263	2069	Epiregulin
256	ETS1	Hs.369438	2113	V-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1 (avian)
257	EXOSC9	Hs.91728	5393	Exosome component 9
258	F12	Hs.1321	2161	Coagulation factor XII (Hageman factor)
259	FAS	Hs.244139	355	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)
260	FASLG	Hs.2007	356	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)
261	FCAR	Hs.659872	2204	Fc fragment of IgA, receptor for
262	FCGR1B	Hs.534956	2210	Fc fragment of IgG, high affinity Ib, receptor (CD64)
263	FCGR2A	Hs.352642	2212	Fc fragment of IgG, low affinity IIa, receptor (CD32)
264	FCGR2B	Hs.654395	2213	Fc fragment of IgG, low affinity IIb, receptor (CD32)
265	FCGR2C	Hs.705497	9103	Fc fragment of IgG, low affinity IIc, receptor for (CD32)
266	FCGR3B	Hs.694258	2215	Fc fragment of IgG, low affinity IIIb, receptor for (CD16)
267	FCGRT	Hs.111903	2217	Fc fragment of IgG, receptor, transporter, alpha
268	FCN1	Hs.440898	2219	Ficolin (collagen/fibrinogen domain containing) 1
269	FCN2	Hs.54517	2220	Ficolin (collagen/fibrinogen domain containing lectin) 2 (hucolin)
270	FGF1	Hs.483635	2246	Fibroblast growth factor 1 (acidic)
271	FGF12	Hs.584758	2257	Fibroblast growth factor 12
272	FGF13	Hs.6540	2258	Fibroblast growth factor 13
273	FGF14	Hs.696392	2259	Fibroblast growth factor 14
274	FGF16	Hs.666364	8823	Fibroblast growth factor 16
275	FGF17	Hs.248192	8822	Fibroblast growth factor 17
276	FGF18	Hs.87191	8817	Fibroblast growth factor 18
277	FGF2	Hs.284244	2247	Fibroblast growth factor 2 (basic)
278	FGF20	Hs.199905	26281	Fibroblast growth factor 20
279	FGF21	Hs.283015	26291	Fibroblast growth factor 21
280	FGF22	Hs.248087	27006	Fibroblast growth factor 22
281	FGF23	Hs.287370	8074	Fibroblast growth factor 23
282	FGF3	Hs.37092	2248	Fibroblast growth factor 3 (murine mammary tumor virus integration site (v-int-2) oncogene homolog)
283	FGF5	Hs.37055	2250	Fibroblast growth factor 5
284	FGF6	Hs.166015	2251	Fibroblast growth factor 6
285	FGF7	Hs.567268	2252	Fibroblast growth factor 7 (keratinocyte growth factor)
286	FGF8	Hs.57710	2253	Fibroblast growth factor 8 (androgen-induced)
287	FGF9	Hs.111	2254	Fibroblast growth factor 9 (glia-activating factor)
288	FGFR1	Hs.264887	2260	Fibroblast growth factor receptor 1 (fms-related tyrosine kinase 2, Pfeiffer syndrome)
289	FGFR2	Hs.533683	2263	Fibroblast growth factor receptor 2 (bacteria-expressed kinase, keratinocyte growth factor receptor syndrome)

290	FGFR3	Hs.1420	2261	Fibroblast growth factor receptor 3 (achondroplasia, thanatophoric dwarfism)
291	FGFR4	Hs.165950	2264	Fibroblast growth factor receptor 4
292	FIGF	Hs.11392	2277	C-fos induced growth factor (vascular endothelial growth factor D)
293	FKBP1A	Hs.471933	2280	FK506 binding protein 1A, 12kDa
294	FLT3	Hs.507590	2322	Fms-related tyrosine kinase 3
295	FLT4	Hs.646917	2324	Fms-related tyrosine kinase 4
296	FOXO3	Hs.220950	2309	Forkhead box O3
297	FOXP3	Hs.247700	50943	Forkhead box P3
298	FTH1	Hs.524910	2495	Ferritin, heavy polypeptide 1
299	FUT4	Hs.390420	2526	Fucosyltransferase 4 (alpha (1,3) fucosyltransferase, myeloid-specific)
300	FUT9	Hs.49117	10690	Fucosyltransferase 9 (alpha (1,3) fucosyltransferase)
301	FYB	Hs.370503	2533	FYN binding protein (FYB-120/130)
302	FYN	Hs.390567	2534	FYN oncogene related to SRC, FGR, YES
303	G6PD	Hs.461047	2539	Glucose-6-phosphate dehydrogenase
304	GALNT2	Hs.654649	2590	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2 (GalNAc-T2)
305	GBP2	Hs.386567	2634	Guanylate binding protein 2, interferon-inducible
306	GCH1	Hs.86724	2643	GTP cyclohydrolase 1 (dopa-responsive dystonia)
307	GEM	Hs.654463	2669	GTP binding protein overexpressed in skeletal muscle
308	GFRA2	Hs.441202	2675	GDNF family receptor alpha 2
309	GLMN	Hs.49105	11146	Glomulin, FKBP associated protein
310	GNL1	Hs.83147	2794	Guanine nucleotide binding protein-like 1
311	GNLY	Hs.105806	10578	Granulysin
312	GPI	Hs.466471	2821	Glucose phosphate isomerase
313	GPR183	Hs.784	1880	G-protein coupled receptor 183
314	GPR44	Hs.299567	11251	G protein-coupled receptor 44
315	GPR65	Hs.513440	8477	G protein-coupled receptor 65
316	GTPBP1	Hs.276925	9567	GTP binding protein 1
317	GZMA	Hs.90708	3001	Granzyme A (granzyme 1, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 3)
318	GZMB	Hs.1051	3002	Granzyme B (granzyme 2, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 1)
319	GZMH	Hs.348264	2999	Granzyme H (cathepsin G-like 2, protein h-CCPX)
320	GZMK	Hs.277937	3003	Granzyme K (granzyme 3; tryptase II)
321	GZMM	Hs.465511	3004	Granzyme M (lymphocyte met-ase 1)
322	HAMP	Hs.8821	57817	Hepcidin antimicrobial peptide
323	HCLS1	Hs.14601	3059	Hematopoietic cell-specific Lyn substrate 1
324	HDAC4	Hs.20516	9759	Histone deacetylase 4
325	HDAC5	Hs.438782	10014	Histone deacetylase 5
326	HDAC7	Hs.200063	51564	Histone deacetylase 7
327	HDAC9	Hs.196054	9734	Histone deacetylase 9
328	HELLS	Hs.655830	3070	Helicase, lymphoid-specific
329	HGF	Hs.396530	3082	Hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor)
330	HIF1A	Hs.597216	3091	Hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)
331	HIF1AN	Hs.500788	55662	Hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit inhibitor
332	HIF3A	Hs.420830	64344	Hypoxia inducible factor 3, alpha subunit
333	HLA-A	Hs.181244	3105	Major histocompatibility complex, class I, A
334	HLA-B	Hs.77961	3106	Major histocompatibility complex, class I, B
335	HLA-C	Hs.449621	3107	Major histocompatibility complex, class I, C
336	HLA-DPA1	Hs.347270	3113	Major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1
337	HLA-DQA1	Hs.387679	3117	Major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1
338	HLA-DQB1	Hs.409934	3119	Major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1
339	HLA-DQB2	Hs.731563	3120	Major histocompatibility complex, class II, DQ beta 2
340	HLA-DRA	Hs.520048	3122	Major histocompatibility complex, class II, DR alpha
341	HLA-E	Hs.650174	3133	Major histocompatibility complex, class I, E
342	HLA-F	Hs.519972	3134	Major histocompatibility complex, class I, F
343	HLA-G	Hs.512152	3135	HLA-G histocompatibility antigen, class I, G
344	HMGB1	Hs.434102	3146	High-mobility group box 1
345	HMOX1	Hs.517581	3162	Heme oxygenase (decycling) 1
346	HRH2	Hs.247885	3274	Histamine receptor H2
347	HSP90AA1	Hs.523560	3320	Heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1

348	HSP90AB1	Hs.509736	3326	Heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B member 1
349	HSPA1A	Hs.520028	3303	Heat shock 70kDa protein 1A
350	HSPD1	Hs.595053	3329	Heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin)
351	ICAM1	Hs.643447	3383	Intercellular adhesion molecule 1 (CD54), human rhinovirus receptor
352	ICOS	Hs.56247	29851	Inducible T-cell co-stimulator
353	ICOSLG	Hs.14155	23308	Inducible T-cell co-stimulator ligand
354	IDO1	Hs.840	3620	Indoleamine 2,3-dioxygenase 1
355	IFI16	Hs.380250	3428	Interferon, gamma-inducible protein 16
356	IFI35	Hs.632258	3430	Interferon-induced protein 35
357	IFI6	Hs.511731	2537	Interferon, alpha-inducible protein 6
358	IFITM2	Hs.458414	10581	Interferon induced transmembrane protein 2 (1-8D)
359	IFITM3	Hs.374650	10410	Interferon induced transmembrane protein 3 (1-8U)
360	IFNA1	Hs.37026	3439	Interferon, alpha 1
361	IFNA10	Hs.282275	3446	Interferon, alpha 10
362	IFNA14	Hs.93907	3448	Interferon, alpha 14
363	IFNA16	Hs.56303	3449	Interferon, alpha 16
364	IFNA17	Hs.282276	3451	Interferon, alpha 17
365	IFNA2	Hs.211575	3440	Interferon, alpha 2
366	IFNA21	Hs.113211	3452	Interferon, alpha 21
367	IFNA4	Hs.1510	3441	Interferon, alpha 4
368	IFNA5	Hs.37113	3442	Interferon, alpha 5
369	IFNA6	Hs.533470	3443	Interferon, alpha 6
370	IFNA7	Hs.282274	3444	Interferon, alpha 7
371	IFNA8	Hs.73890	3445	Interferon, alpha 8
372	IFNAR1	Hs.529400	3454	Interferon (alpha, beta and omega) receptor 1
373	IFNAR2	Hs.701988	3455	Interferon (alpha, beta and omega) receptor 2
374	IFNB1	Hs.93177	3456	Interferon, beta 1, fibroblast
375	IFNG	Hs.856	3458	Interferon, gamma
376	IFNGR1	Hs.520414	3459	Interferon gamma receptor 1
377	IFNGR2	Hs.634632	3460	Interferon gamma receptor 2 (interferon gamma transducer 1)
378	IFNW1	Hs.73010	3467	Interferon, omega 1
379	IGF1R	Hs.643120	3480	Insulin-like growth factor 1 receptor
380	IGF2R	Hs.487062	3482	Insulin-like growth factor 2 receptor
381	IGFBP3	Hs.450230	3486	Insulin-like growth factor binding protein 3
382	IGHA1	Hs.648398	3493	Immunoglobulin heavy constant alpha 1
383	IGHD	Hs.510635	3495	Immunoglobulin heavy constant delta
384	IGHM	-	3507	Immunoglobulin heavy constant mu
385	IGJ	Hs.700610	3512	Immunoglobulin J polypeptide, linker protein for immunoglobulin alpha and mu polypeptides
386	IGKV4-1	-	28908	Immunoglobulin kappa variable 4-1
387	IGLL1	Hs.348935	3543	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 1
388	IGSF6	Hs.530902	10261	Immunoglobulin superfamily, member 6
389	IK	Hs.421245	3550	IK cytokine, down-regulator of HLA II
390	IKBKAP	Hs.494738	8518	Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase complex-associated protein
391	IKBKE	Hs.321045	9641	Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase epsilon
392	IKBKG	Hs.43505	8517	Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase gamma
393	IL10	Hs.193717	3586	Interleukin 10
394	IL10RA	Hs.504035	3587	Interleukin 10 receptor, alpha
395	IL10RB	Hs.654593	3588	Interleukin 10 receptor, beta
396	IL11	Hs.467304	3589	Interleukin 11
397	IL11RA	Hs.591088	3590	Interleukin 11 receptor, alpha
398	IL12A	Hs.673	3592	Interleukin 12A (natural killer cell stimulatory factor 1, cytotoxic lymphocyte maturation factor 1, p35)
399	IL12B	Hs.674	3593	Interleukin 12B (natural killer cell stimulatory factor 2, cytotoxic lymphocyte maturation factor 2, p40)
400	IL12RB1	Hs.567294	3594	Interleukin 12 receptor, beta 1
401	IL12RB2	Hs.479347	3595	Interleukin 12 receptor, beta 2
402	IL13	Hs.845	3596	Interleukin 13
403	IL13RA1	Hs.496646	3597	Interleukin 13 receptor, alpha 1
404	IL13RA2	Hs.336046	3598	Interleukin 13 receptor, alpha 2
405	IL15	Hs.654378	3600	Interleukin 15

406	IL15RA	Hs.524117	3601	Interleukin 15 receptor, alpha
407	IL16	Hs.459095	3603	Interleukin 16 (lymphocyte chemoattractant factor)
408	IL17A	Hs.41724	3605	Interleukin 17A
409	IL17B	Hs.156979	27190	Interleukin 17B
410	IL17RA	Hs.129751	23765	Interleukin 17 receptor A
411	IL17RB	Hs.654970	55540	Interleukin 17 receptor B
412	IL17RC	Hs.129959	84818	Interleukin 17 receptor C
413	IL18	Hs.83077	3606	Interleukin 18 (interferon-gamma-inducing factor)
414	IL18R1	Hs.469521	8809	Interleukin 18 receptor 1
415	IL18RAP	Hs.158315	8807	Interleukin 18 receptor accessory protein
416	IL19	Hs.661017	29949	Interleukin 19
417	IL1A	Hs.1722	3552	Interleukin 1, alpha
418	IL1B	Hs.126256	3553	Interleukin 1, beta
419	IL1F6	Hs.278910	27179	Interleukin 1 family, member 6 (epsilon)
420	IL1F7	Hs.166371	27178	Interleukin 1 family, member 7 (zeta)
421	IL1R1	Hs.701982	3554	Interleukin 1 receptor, type I
422	IL1R2	Hs.25333	7850	Interleukin 1 receptor, type II
423	IL1RAP	Hs.478673	3556	Interleukin 1 receptor accessory protein
424	IL1RAPL1	Hs.658912	11141	Interleukin 1 receptor accessory protein-like 1
425	IL1RAPL2	Hs.675519	26280	Interleukin 1 receptor accessory protein-like 2
426	IL1RL1	Hs.66	9173	Interleukin 1 receptor-like 1
427	IL1RL2	Hs.659863	8808	Interleukin 1 receptor-like 2
428	IL1RN	Hs.81134	3557	Interleukin 1 receptor antagonist
429	IL2	Hs.89679	3558	Interleukin 2
430	IL20RA	Hs.445868	53832	Interleukin 20 receptor, alpha
431	IL21	Hs.567559	59067	Interleukin 21
432	IL21R	Hs.210546	50615	Interleukin 21 receptor
433	IL22	Hs.287369	50616	Interleukin 22
434	IL22RA1	Hs.110915	58985	Interleukin 22 receptor, alpha 1
435	IL23A	Hs.98309	51561	Interleukin 23, alpha subunit p19
436	IL24	Hs.58831	11009	Interleukin 24
437	IL25	Hs.302036	64806	Interleukin 25
438	IL26	Hs.272350	55801	Interleukin 26
439	IL27RA	Hs.132781	9466	Interleukin 27 receptor, alpha
440	IL2RA	Hs.231367	3559	Interleukin 2 receptor, alpha
441	IL2RB	Hs.474787	3560	Interleukin 2 receptor, beta
442	IL2RG	Hs.84	3561	Interleukin 2 receptor, gamma (severe combined immunodeficiency)
443	IL3	Hs.694	3562	Interleukin 3 (colony-stimulating factor, multiple)
444	IL32	Hs.943	9235	Interleukin 32
445	IL33	Hs.348390	90865	Interleukin 33
446	IL3RA	Hs.632790	3563	Interleukin 3 receptor, alpha (low affinity)
447	IL4	Hs.73917	3565	Interleukin 4
448	IL4R	Hs.513457	3566	Interleukin 4 receptor
449	IL5	Hs.2247	3567	Interleukin 5 (colony-stimulating factor, eosinophil)
450	IL5RA	Hs.68876	3568	Interleukin 5 receptor, alpha
451	IL6	Hs.654458	3569	Interleukin 6 (interferon, beta 2)
452	IL6R	Hs.695954	3570	Interleukin 6 receptor
453	IL6ST	Hs.532082	3572	Interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)
454	IL7	Hs.591873	3574	Interleukin 7
455	IL7R	Hs.591742	3575	Interleukin 7 receptor
456	IL8	Hs.624	3576	Interleukin 8
457	IL9	Hs.960	3578	Interleukin 9
458	INH A	Hs.407506	3623	Inhibin, alpha
459	INHBA	Hs.583348	3624	Inhibin, beta A
460	INS	Hs.654579	3630	Insulin
461	IRF1	Hs.436061	3659	Interferon regulatory factor 1
462	IRF4	Hs.401013	3662	Interferon regulatory factor 4
463	IRF8	Hs.137427	3394	Interferon regulatory factor 8

464	ITGA4	Hs.694732	3676	Integrin, alpha 4 (antigen CD49D, alpha 4 subunit of VLA-4 receptor)
465	ITGAE	Hs.513867	3682	Integrin, alpha E (antigen CD103, human mucosal lymphocyte antigen 1; alpha polypeptide)
466	ITGAL	Hs.174103	3683	Integrin, alpha L (antigen CD11A (p180), lymphocyte function-associated antigen 1; alpha polypeptide)
467	ITGAM	Hs.172631	3684	Integrin, alpha M (complement component 3 receptor 3 subunit)
468	ITGAX	Hs.248472	3687	Integrin, alpha X (complement component 3 receptor 4 subunit)
469	ITGB1	Hs.695946	3688	Integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)
470	ITGB2	Hs.375957	3689	Integrin, beta 2 (complement component 3 receptor 3 and 4 subunit)
471	ITGB7	Hs.654470	3695	Integrin, beta 7
472	ITIH1	Hs.420257	3697	Inter-alpha (globulin) inhibitor H1
473	JAG1	Hs.224012	182	Jagged 1 (Alagille syndrome)
474	JAG2	Hs.433445	3714	Jagged 2
475	KDR	Hs.479756	3791	Kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase)
476	KIF13B	Hs.444767	23303	Kinesin family member 13B
477	KIR2DL1	Hs.654605	3802	Killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, long cytoplasmic tail, 1
478	KIR2DL2	-	3803	Killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, long cytoplasmic tail, 2
479	KIR2DL3	Hs.731378	3804	Killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, long cytoplasmic tail, 3
480	KIR2DL4	Hs.651287	3805	Killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, long cytoplasmic tail, 4
481	KIR2DL5A	Hs.676464	57292	Killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, long cytoplasmic tail, 5A
482	KIR2DS1	Hs.720721	3806	Killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, short cytoplasmic tail, 1
483	KIR2DS3	-	3808	Killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, short cytoplasmic tail, 3
484	KIR2DS4	Hs.654608	3809	Killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, short cytoplasmic tail, 4
485	KIR3DL1	Hs.645228	3811	Killer cell immunoglobulin-like receptor, three domains, long cytoplasmic tail, 1
486	KIR3DL3	Hs.645224	115653	Killer cell immunoglobulin-like receptor, three domains, long cytoplasmic tail, 3
487	KIR3DS1	Hs.659860	3813	Killer cell immunoglobulin-like receptor, three domains, short cytoplasmic tail, 1
488	KIT	Hs.479754	3815	V-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog
489	KITLG	Hs.1048	4254	KIT ligand
490	KLF6	Hs.4055	1316	Kruppel-like factor 6
491	KLRB1	Hs.169824	3820	Killer cell lectin-like receptor subfamily B, member 1
492	KLRC3	Hs.654362	3823	Killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 3
493	KLRC4	Hs.665704	8302	Killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 4
494	KLRD1	Hs.562457	3824	Killer cell lectin-like receptor subfamily D, member 1
495	KLRF1	Hs.183125	51348	Killer cell lectin-like receptor subfamily F, member 1
496	KLRG1	Hs.558446	10219	Killer cell lectin-like receptor subfamily G, member 1
497	KLRK1	Hs.387787	22914	Killer cell lectin-like receptor subfamily K, member 1
498	KRT1	Hs.80828	3848	Keratin 1 (epidermolytic hyperkeratosis)
499	KYNU	Hs.470126	8942	Kynureninase (L-kynurenine hydrolase)
500	LAG3	Hs.409523	3902	Lymphocyte-activation gene 3
501	LAIR1	Hs.572535	3903	Leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor 1
502	LAIR2	Hs.43803	3904	Leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor 2
503	LAMP3	Hs.518448	27074	Lysosomal-associated membrane protein 3
504	LAT2	Hs.647049	7462	Linker for activation of T cells family, member 2
505	LAX1	Hs.272794	54900	Lymphocyte transmembrane adaptor 1
506	LBP	Hs.154078	3929	Lipopolysaccharide binding protein
507	LCK	Hs.470627	3932	Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase
508	LCP2	Hs.304475	3937	Lymphocyte cytosolic protein 2 (SH2 domain containing leukocyte protein of 76kDa)
509	LDB1	Hs.702266	8861	LIM domain binding 1
510	LIF	Hs.2250	3976	Leukemia inhibitory factor (cholinergic differentiation factor)
511	LIFR	Hs.133421	3977	Leukemia inhibitory factor receptor alpha
512	LIG1	Hs.1770	3978	Ligase I, DNA, ATP-dependent
513	LIG3	Hs.100299	3980	Ligase III, DNA, ATP-dependent
514	LIG4	Hs.166091	3981	Ligase IV, DNA, ATP-dependent
515	LILRA1	Hs.710507	11024	Leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A (without TM domain), member 1
516	LILRA2	Hs.655593	11027	Leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A (without TM domain), member 2
517	LILRA3	Hs.113277	11026	Leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A (without TM domain), member 3
518	LILRA4	Hs.406708	23547	Leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A (without TM domain), member 4
519	LILRA5	Hs.710986	353514	Leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A (without TM domain), member 5
520	LILRA6	Hs.688335	79168	Leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A (without TM domain), member 6
521	LILRB1	Hs.655593	10859	Leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 1

522	LILRB2	Hs.655652	10288	Leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 2
523	LILRB3	Hs.631592	11025	Leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 3
524	LILRB4	Hs.67846	11006	Leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 4
525	LILRB5	Hs.655338	10990	Leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 5
526	LOC254896	Hs.735240	254896	Uncharacterized LOC254896
527	LOC91316	Hs.148656	91316	Similar to bK246H3.1 (immunoglobulin lambda-like polypeptide 1, pre-B-cell specific)
528	LTA	Hs.36	4049	Lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1)
529	LTB	Hs.376208	4050	Lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3)
530	LTB4R	Hs.655431	1241	Leukotriene B4 receptor
531	LTB4R2	Hs.642693	56413	Leukotriene B4 receptor 2
532	LTBR	Hs.1116	4055	Lymphotoxin beta receptor (TNFR superfamily, member 3)
533	LTF	Hs.529517	4057	Lactotransferrin
534	LY75	Hs.153563	4065	Lymphocyte antigen 75
535	LY86	Hs.653138	9450	Lymphocyte antigen 86
536	LY9	Hs.403857	4063	Lymphocyte antigen 9
537	LYN	Hs.699154	4067	V-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog
538	LYST	Hs.532411	1130	Lysosomal trafficking regulator
539	MADCAM1	Hs.102598	8174	Mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1
540	MAFB	Hs.702085	9935	V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B (avian)
541	MAG	Hs.348346	27307	Malignancy-associated gene
542	MALT1	Hs.601217	10892	Mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1
543	MAP3K7	Hs.644143	6885	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7
544	MAP4K2	Hs.534341	5871	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 2
545	MASP1	Hs.89983	5648	Mannan-binding lectin serine peptidase 1 (C4/C2 activating component of Ra-reactive factor)
546	MASP2	Hs.655645	10747	Mannan-binding lectin serine peptidase 2
547	MBL2	Hs.499674	4153	Mannose-binding lectin (protein C) 2, soluble (opsonic defect)
548	MBP	Hs.551713	4155	Myelin basic protein
549	MEIS3P1	Hs.356135	4213	Meis homeobox 3 pseudogene 1
550	MET	Hs.132966	4233	Met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)
551	MIA3	Hs.118474	375056	Melanoma inhibitory activity family, member 3
552	MICA	Hs.549053	4276	MHC class I polypeptide-related sequence A
553	MICB	Hs.211580	4277	MHC class I polypeptide-related sequence B
554	MIF	Hs.407995	4282	Macrophage migration inhibitory factor (glycosylation-inhibiting factor)
555	MLF1	Hs.85195	4291	Myeloid leukemia factor 1
556	MLL	Hs.258855	4297	Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila)
557	MMP7	Hs.2256	4316	Matrix metallopeptidase 7 (matrilysin, uterine)
558	MMP9	Hs.297413	4318	Matrix metallopeptidase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)
559	MNX1	Hs.37035	3110	Motor neuron and pancreas homeobox 1
560	MR1	Hs.101840	3140	Major histocompatibility complex, class I-related
561	MS4A1	Hs.438040	931	Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1
562	MS4A2	Hs.386748	2206	Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 2 (Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor)
563	MSH2	Hs.597656	4436	MutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 (E. coli)
564	MSN	Hs.87752	4478	Moesin
565	MSR1	Hs.147635	4481	Macrophage scavenger receptor 1
566	MYD88	Hs.82116	4615	Myeloid differentiation primary response gene (88)
567	MYH9	Hs.474751	4627	Myosin, heavy chain 9, non-muscle
568	MYST1	Hs.533803	84148	MYST histone acetyltransferase 1
569	MYST3	Hs.491577	7994	MYST histone acetyltransferase (monocytic leukemia) 3
570	NCAM1	Hs.503878	4684	Neural cell adhesion molecule 1
571	NCF1C	Hs.648940	654817	Neutrophil cytosolic factor 1C pseudogene
572	NCF2	Hs.587558	4688	Neutrophil cytosolic factor 2 (65kDa, chronic granulomatous disease, autosomal 2)
573	NCF4	Hs.474781	4689	Neutrophil cytosolic factor 4, 40kDa
574	NCK1	Hs.477693	4690	NCK adaptor protein 1
575	NCK2	Hs.695241	8440	NCK adaptor protein 2
576	NCOA6	Hs.368971	23054	Nuclear receptor coactivator 6
577	NCR1	Hs.97084	9437	Natural cytotoxicity triggering receptor 1
578	NCR2	Hs.194721	9436	Natural cytotoxicity triggering receptor 2
579	NCR3	Hs.509513	259197	Natural cytotoxicity triggering receptor 3

580	NFIL3	Hs.79334	4783	Nuclear factor, interleukin 3 regulated
581	NGF	Hs.2561	4803	Nerve growth factor (beta polypeptide)
582	NGFR	Hs.415768	4804	Nerve growth factor receptor (TNFR superfamily, member 16)
583	NHEJ1	Hs.225988	79840	Nonhomologous end-joining factor 1
584	NKX2-5	Hs.54473	1482	NK2 transcription factor related, locus 5 (Drosophila)
585	NOD2	Hs.592072	64127	Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2
586	NOS1	Hs.654410	4842	Nitric oxide synthase 1 (neuronal)
587	NOS2	Hs.709191	4843	Nitric oxide synthase 2, inducible
588	NOS3	Hs.699165	4846	Nitric oxide synthase 3 (endothelial cell)
589	NOTCH1	Hs.495473	4851	Notch homolog 1, translocation-associated (Drosophila)
590	NOTCH2	Hs.487360	4853	Notch homolog 2 (Drosophila)
591	NOTCH4	Hs.436100	4855	Notch homolog 4 (Drosophila)
592	NPM1	Hs.557550	4869	Nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin)
593	NPTN	Hs.187866	27020	Neuroplastin
594	ODZ1	Hs.23796	10178	Odz, odd Oz/ten-m homolog 1(Drosophila)
595	OPRD1	Hs.372	4985	Opioid receptor, delta 1
596	OPRK1	Hs.106795	4986	Opioid receptor, kappa 1
597	PAX5	Hs.654464	5079	Paired box 5
598	PDCD1	Hs.158297	5133	Programmed cell death 1
599	PDCD1LG2	Hs.532279	80380	Programmed cell death 1 ligand 2
600	PDGFA	Hs.705381	5154	Platelet-derived growth factor alpha polypeptide
601	PDGFB	Hs.1976	5155	Platelet-derived growth factor beta polypeptide (simian sarcoma viral (v-sis) oncogene homolog)
602	PDGFC	Hs.570855	56034	Platelet derived growth factor C
603	PDGFD	Hs.352298	80310	Platelet derived growth factor D
604	PDGFRA	Hs.74615	5156	Platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide
605	PDGFRB	Hs.509067	5159	Platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide
606	PF4	Hs.81564	5196	Platelet factor 4 (chemokine (C-X-C motif) ligand 4)
607	PF4V1	Hs.72933	5197	Platelet factor 4 variant 1
608	PGF	Hs.252820	5228	Placental growth factor, vascular endothelial growth factor-related protein
609	PGLYRP1	Hs.137583	8993	Peptidoglycan recognition protein 1
610	PGLYRP4	Hs.58356	57115	Peptidoglycan recognition protein 4
611	PGRMC1	Hs.90061	10857	Progesterone receptor membrane component 1
612	PLA2G1B	Hs.992	5319	Phospholipase A2, group 1B (pancreas)
613	PLUNC	Hs.211092	51297	Palate, lung and nasal epithelium carcinoma associated
614	PMF1	Hs.530479	11243	Polyamine-modulated factor 1
615	PML	Hs.526464	5371	Promyelocytic leukemia
616	PNP	Hs.75514	4860	Purine nucleoside phosphorylase
617	POLL	Hs.523230	27343	Polymerase (DNA directed), lambda
618	POU2AF1	Hs.654525	5450	POU class 2 associating factor 1
619	POU2F2	Hs.654420	5452	POU class 2 homeobox 2
620	PPARG	Hs.162646	5468	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
621	PPBP	Hs.2164	5473	Pro-platelet basic protein (chemokine (C-X-C motif) ligand 7)
622	PRDX3	Hs.523302	10935	Peroxiredoxin 3
623	PRF1	Hs.2200	5551	Perforin 1 (pore forming protein)
624	PRG3	Hs.251386	10394	Proteoglycan 3
625	PRKRA	Hs.632540	8575	Protein kinase, interferon-inducible double stranded RNA dependent activator
626	PRLR	Hs.368587	5618	Prolactin receptor
627	PROS1	Hs.64016	5627	Protein S (alpha)
628	PSMB10	Hs.9661	5699	Proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 10
629	PTAFR	Hs.77542	5724	Platelet-activating factor receptor
630	PTCRA	Hs.169002	171558	Pre T-cell antigen receptor alpha
631	PTGER4	Hs.199248	5734	Prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4)
632	PTGS2	Hs.196384	5743	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)
633	PTPRC	Hs.654514	5788	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, C
634	PVR	Hs.171844	5817	Poliovirus receptor
635	PVRL1	Hs.334846	5818	Poliovirus receptor-related 1 (herpesvirus entry mediator C)
636	PVRL2	Hs.655455	5819	Poliovirus receptor-related 2 (herpesvirus entry mediator B)
637	PXDN	Hs.332197	7837	Peroxidasin homolog (Drosophila)

638	RAG1	Hs.73958	5896	Recombination activating gene 1
639	RAG2	Hs.159376	5897	Recombination activating gene 2
640	RARA	Hs.654583	5914	Retinoic acid receptor, alpha
641	RBP4	Hs.50223	5950	Retinol binding protein 4, plasma
642	RELA	Hs.502875	5970	V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A, nuclear factor of kappa light polypeptide
643	RFX1	Hs.655215	5989	Regulatory factor X, 1 (influences HLA class II expression)
644	RGS1	Hs.75256	5996	Regulator of G-protein signaling 1
645	RHOH	Hs.654594	399	Ras homolog gene family, member H
646	ROCK1	Hs.306307	6093	Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1
647	RPS14	Hs.381126	6208	Ribosomal protein S14
648	RPS19	Hs.438429	6223	Ribosomal protein S19
649	RSAD2	Hs.17518	91543	Radical S-adenosyl methionine domain containing 2
650	RTKL1	Hs.730810	51750	Regulator of telomere elongation helicase 1
651	RUNX1	Hs.149261	861	Runx-related transcription factor 1 (acute myeloid leukemia 1; aml1 oncogene)
652	S100A7	Hs.112408	6278	S100 calcium binding protein A7
653	S100A8	Hs.416073	6279	S100 calcium binding protein A8
654	S100A9	Hs.112405	6280	S100 calcium binding protein A9
655	S1PR4	Hs.662006	8698	Sphingosine-1-phosphate receptor 4
656	SAMHD1	Hs.580681	25939	SAM domain and HD domain 1
657	SART1	Hs.502883	9092	Squamous cell carcinoma antigen recognized by T cells
658	SBNO2	Hs.408708	22904	Strawberry notch homolog 2 (Drosophila)
659	SCARB2	Hs.349656	950	Scavenger receptor class B, member 2
660	SCG2	Hs.516726	7857	Secretogranin II (chromogranin C)
661	SCIN	Hs.655515	85477	Scinderin
662	SDF2	Hs.514036	6388	Stromal cell-derived factor 2
663	SDF4	Hs.42806	51150	Stromal cell derived factor 4
664	SECTM1	Hs.558009	6398	Secreted and transmembrane 1
665	SEMA3C	Hs.269109	10512	Sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3C
666	SEMA4D	Hs.655281	10507	Sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic
667	SEMA7A	Hs.24640	8482	Semaphorin 7A, GPI membrane anchor (John Milton Hagen blood group)
668	SERPINB3	Hs.227948	6317	Serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 3
669	SERPINB4	Hs.123035	6318	Serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 4
670	SFTPD	Hs.253495	6441	Surfactant, pulmonary-associated protein D
671	SIGLEC1	Hs.31869	6614	Sialic acid binding Ig-like lectin 1, sialoadhesin
672	SIGLEC5	Hs.310333	8778	Sialic acid binding Ig-like lectin 5
673	SIGLEC6	Hs.397255	946	Sialic acid binding Ig-like lectin 6
674	SIGLEC7	Hs.699304	27036	Sialic acid binding Ig-like lectin 7
675	SIGLEC8	Hs.447899	27181	Sialic acid binding Ig-like lectin 8
676	SIGLEC9	Hs.245828	27180	Sialic acid binding Ig-like lectin 9
677	SIRPG	Hs.590883	55423	Signal-regulatory protein gamma
678	SIT1	Hs.88012	27240	Signaling threshold regulating transmembrane adaptor 1
679	SIVA1	Hs.112058	10572	SIVA1, apoptosis-inducing factor
680	SKAP1	Hs.316931	8631	Src kinase associated phosphoprotein 1
681	SLAMF7	Hs.517265	57823	SLAM family member 7
682	SLC11A1	Hs.591607	6556	Solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters), member 1
683	SMAD3	Hs.618504	4088	SMAD family member 3
684	SMAD6	Hs.153863	4091	SMAD family member 6
685	SNRK	Hs.476052	54861	SNF related kinase
686	SOC5	Hs.468426	9655	Suppressor of cytokine signaling 5
687	SOD1	Hs.443914	6647	Superoxide dismutase 1, soluble (amyotrophic lateral sclerosis 1 (adult))
688	SOX4	Hs.699195	6659	SRY (sex determining region Y)-box 4
689	SP100	Hs.369056	6672	SP100 nuclear antigen
690	SP2	Hs.514276	6668	Sp2 transcription factor
691	SPG21	Hs.242458	51324	Spastic paraplegia 21 (autosomal recessive, Mast syndrome)
692	SPI1	Hs.502511	6688	Spleen focus forming virus (SFFV) proviral integration oncogene spi1
693	SPINK5	Hs.331555	11005	Serine peptidase inhibitor, Kazal type 5
694	ST6GAL1	Hs.207459	6480	ST6 beta-galactosamide alpha-2,6-sialyltransferase 1
695	SYK	Hs.371720	6850	Spleen tyrosine kinase

696	TAP1	Hs.352018	6890	Transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)
697	TAP2	Hs.502	6891	Transporter 2, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)
698	TAPBP	Hs.370937	6892	TAP binding protein (tapasin)
699	TARBP2	Hs.326	6895	TAR (HIV-1) RNA binding protein 2
700	TAZ	Hs.409911	6901	Tafazzin (cardiomyopathy, dilated 3A (X-linked); endocardial fibroelastosis 2; Barth syndrome)
701	TBX1	Hs.173984	6899	T-box 1
702	TBX21	Hs.272409	30009	T-box 21
703	TCF12	Hs.511504	6938	Transcription factor 12 (HTF4, helix-loop-helix transcription factors 4)
704	TCF3	Hs.371282	6929	Transcription factor 3 (E2A immunoglobulin enhancer binding factors E12/E47)
705	TCF7	Hs.573153	6932	Transcription factor 7 (T-cell specific, HMG-box)
706	TGFA	Hs.170009	7039	Transforming growth factor, alpha
707	TGFB1	Hs.645227	7040	Transforming growth factor, beta 1
708	TGFB2	Hs.133379	7042	Transforming growth factor, beta 2
709	TGFB3	Hs.592317	7043	Transforming growth factor, beta 3
710	TGFBR1	Hs.494622	7046	Transforming growth factor, beta receptor I (activin A receptor type II-like kinase, 53kDa)
711	TGFBR2	Hs.82028	7048	Transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa)
712	TGFBR3	Hs.482390	7049	Transforming growth factor, beta receptor III
713	THBS1	Hs.164226	7057	Thrombospondin 1
714	THY1	Hs.653181	7070	Thy-1 cell surface antigen
715	TLR1	Hs.621817	7096	Toll-like receptor 1
716	TLR2	Hs.519033	7097	Toll-like receptor 2
717	TLR3	Hs.657724	7098	Toll-like receptor 3
718	TLR4	Hs.174312	7099	Toll-like receptor 4
719	TLR5	Hs.604542	7100	Toll-like receptor 5
720	TLR6	Hs.662185	10333	Toll-like receptor 6
721	TLR7	Hs.659215	51284	Toll-like receptor 7
722	TLR8	Hs.660543	51311	Toll-like receptor 8
723	TM7SF4	Hs.652230	81501	Transmembrane 7 superfamily member 4
724	TMX1	Hs.125221	81542	Thioredoxin-related transmembrane protein 1
725	TNF	Hs.241570	7124	Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)
726	TNFAIP1	Hs.76090	7126	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 1 (endothelial)
727	TNFRSF10B	Hs.521456	8795	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b
728	TNFRSF10C	Hs.655801	8794	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10c, decoy without an intracellular domain
729	TNFRSF10D	Hs.213467	8793	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10d, decoy with truncated death domain
730	TNFRSF11A	Hs.204044	8792	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11a, NFkB activator
731	TNFRSF11B	Hs.81791	4982	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b (osteoprotegerin)
732	TNFRSF12A	Hs.355899	51330	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12A
733	TNFRSF13B	Hs.158341	23495	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13B
734	TNFRSF14	Hs.512898	8764	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 14 (herpesvirus entry mediator)
735	TNFRSF17	Hs.2556	608	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 17
736	TNFRSF1A	Hs.279594	7132	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A
737	TNFRSF1B	Hs.256278	7133	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B
738	TNFRSF21	Hs.443577	27242	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21
739	TNFRSF25	Hs.462529	8718	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 25
740	TNFRSF4	Hs.129780	7293	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4
741	TNFRSF8	Hs.1314	943	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 8
742	TNFRSF9	Hs.654459	3604	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9
743	TNFSF10	Hs.478275	8743	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10
744	TNFSF11	Hs.333791	8600	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11
745	TNFSF12	Hs.54673	8742	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 12
746	TNFSF13	Hs.54673	8741	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13
747	TNFSF14	Hs.129708	8740	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 14
748	TNFSF15	Hs.241382	9966	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 15
749	TNFSF18	Hs.248197	8995	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 18
750	TNFSF4	Hs.181097	7292	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 4 (tax-transcriptionally activated glycoprotein)
751	TNFSF8	Hs.654445	944	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 8
752	TNFSF9	Hs.1524	8744	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 9
753	TOLLIP	Hs.368527	54472	Toll interacting protein

754	TPD52	Hs.368433	7163	Tumor protein D52
755	TRAF2	Hs.522506	7186	TNF receptor-associated factor 2
756	TRAF6	Hs.591983	7189	TNF receptor-associated factor 6
757	TRAT1	Hs.138701	50852	T cell receptor associated transmembrane adaptor 1
758	TRBC1	-	28639	T cell receptor beta constant 1
759	TREM1	Hs.283022	54210	Triggering receptor expressed on myeloid cells 1
760	TREM2	Hs.435295	54209	Triggering receptor expressed on myeloid cells 2
761	TRGV5	-	6978	T cell receptor gamma variable 5
762	TRIM10	Hs.274295	10107	Tripartite motif-containing 10
763	TRIM22	Hs.501778	10346	Tripartite motif-containing 22
764	TRPC4AP	Hs.168073	26133	Transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 4 associated protein
765	TUBB	Hs.636480	203068	Tubulin, beta
766	TUBB2C	Hs.433615	10383	Tubulin, beta 2C
767	TUBB3	Hs.511743	10381	Tubulin, beta 3
768	TXLNA	Hs.699306	200081	Taxilin alpha
769	TYROBP	Hs.515369	7305	TYRO protein tyrosine kinase binding protein
770	UBE2N	Hs.524630	7334	Ubiquitin-conjugating enzyme E2N (UBC13 homolog, yeast)
771	ULBP2	Hs.656778	80328	UL16 binding protein 2
772	VAMP7	Hs.24167	6845	Vesicle-associated membrane protein 7
773	VCAM1	Hs.109225	7412	Vascular cell adhesion molecule 1
774	VEGFA	Hs.73793	7422	Vascular endothelial growth factor A
775	VEGFB	Hs.78781	7423	Vascular endothelial growth factor B
776	VEGFC	Hs.435215	7424	Vascular endothelial growth factor C
777	VIPR1	Hs.348500	7433	Vasoactive intestinal peptide receptor 1
778	VPREB1	Hs.247979	7441	Pre-B lymphocyte gene 1
779	VTCN1	Hs.546434	79679	V-set domain containing T cell activation inhibitor 1
780	VTN	Hs.2257	7448	Vitronectin
781	WAS	Hs.2157	7454	Wiskott-Aldrich syndrome (eczema-thrombocytopenia)
782	XBP1	Hs.437638	7494	X-box binding protein 1
783	XCL1	Hs.546295	6375	Chemokine (C motif) ligand 1
784	XCR1	Hs.248116	2829	Chemokine (C motif) receptor 1
785	YTHDF2	Hs.532286	51441	YTH domain family, member 2
786	ZAP70	Hs.234569	7535	Zeta-chain (TCR) associated protein kinase 70kDa
787	ZBTB16	Hs.591945	7704	Zinc finger and BTB domain containing 16
788	ZEB1	Hs.124503	6935	Zinc finger E-box binding homeobox 1
789	ZNF160	Hs.655967	90338	Zinc finger protein 160
790	ZNF3	Hs.435302	7551	Zinc finger protein 3
791	ZNF675	Hs.264345	171392	Zinc finger protein 675

7.2. liste des abréviations par ordre alphabétique

Certaines abréviations sont celles les plus communément utilisées. Elles correspondent parfois aux termes anglais. A chaque fois, les termes sont traduits entre parenthèses dans le texte.

a : adjacence

AA : astrocytome anaplasique

7AAD : 7-aminoactinomycine D

ACVR2A : récepteur de l'activine A de type 2A

ADC : coefficient de diffusion apparent, en anglais apparent diffusion coefficient

ADCC : cytotoxicité dépendante des anticorps, en anglais antibody-dependent cellular cytotoxicity

ADN : acide désoxyribonucléique

Ag : antigène

AIF1 : facteur inflammatoire 1 d'allogreffe, en anglais allograft inflammatory factor 1

5 ALA : acide 5 aminolevulinique

ANOCEF : association des neuro-oncologues d'expression française

ARG1 : arginase 1

ARN : acide ribonucléique

ASCO : american society of clinical oncology

BCR : récepteur cellulaires B, en anglais B cell receptor

BHE : barrière hémato-encéphalique

CCL et CXCL : chimiokines

CD : cluster de différenciation

CDK : cycline dépendante kinase

CFSE : carboxyfluorescein succinimidyl ester

CGH-array : puce d'hybridation génomique comparative

CMH I : complexe majeur d'histocompatibilité de classe I

CMH II : complexe majeur d'histocompatibilité de classe II

CMV : cytomégalovirus

CPA : cellules présentatrices d'antigènes

CSF : facteur de croissance de cellules hématopoïétiques, en anglais colony stimulating factor

CTL : lymphocytes T cytotoxiques, en anglais cytotoxic T lymphocyte

CTV : volume anatomo-clinique, en anglais clinical tumour volume

CXCR : chimiokine de type C-X-C

DC : cellules dendritiques, en anglais dendritic cell

DMEM : contenant du milieu minimum essentiel d'Eagle modifié par Dulbecco

DMSO : diméthylsulfoxyde

EGF : facteur de croissance épidermique, en anglais epidermal growth factor

EGFR : récepteur du facteur de croissance épidermique, en anglais epidermal growth factor receptor

EGFRvIII : variant III de l'EGFR

EORTC : organisation européenne pour la recherche et le traitement du cancer, en anglais European Organisation for Research and Treatment of Cancer

18-FDG: 18 fluorodésoxyglucose
18-FET : 18 fluoro-éthyl-tyrosine
FGF : facteur de croissance fibroblastique, en anglais fibroblast growth factor ou basic
FoxP3: facteur de transcription Scurfin, en anglais forkhead box protein P3
FSC : forward scatter

GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GASC: cellules stromales associées au GBM, en anglais GB-associated stromal cell
GBM : glioblastome
GBMO: GBM à composante oligodendrogliale
GILT: enzyme lysosomale thiol réductase inducible par l'IFN γ , en anglais γ IFN-inducible lysosomal thiol-reductase
GM-CSF : facteur de croissance des granulocytes et macrophages, en anglais granulocyte macrophage colony stimulating factor
GTV : volume tumoral macroscopique, en anglais growth tumour volume
Gy : gray

2HG : 2-hydroxyglutarate
HGF: facteur de croissance hépatocytaire, en anglais hepatocyte growth factor
HIF-1 α : facteur induit par l'hypoxie-1 α , en anglais hypoxia-inducible factor-1 α
HLA : human leucocyte antigen
HLH : hémianopsie latérale homonyme
HPRT1 : hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
HSA : albumine sérique humaine, en anglais human serum albumin
HTIC : hypertension intracrânienne

Iba1 : en anglais ionized calcium binding adaptor molecule 1
IC : intervalle de confiance
ICAM-1: molécule d'adhésion intercellulaire 1, en anglais intercellular adhesion molecule 1
IDH : isocitrate deshydrogénase
IDO : indoleamine 2,3-dioxygénase
IE1 : protéine du CMV humain, en anglais : immediate-early 1
IFI30 : protéine 30 inducible par l'IFN γ , en anglais IFN γ -inducible protein 30
IFN : interféron
IFNAR : récepteur de l'IFN α , en anglais IFN α receptor
IFNGR : récepteur de l'IFN γ , en anglais IFN γ receptor
Ig : immunoglobuline
IGF : facteur de croissance apparenté à l'insuline, insulin-like growth factor en anglais
IGFBP2 : protéine 2 de liaison de l'IGF, IGF binding protein 2 en anglais
IHC : immunohistochimie
IL : interleukine
IL13RA2 : récepteur de l'interleukine 13, sous-unité α 2
ILK : kinases liées aux intégrines, en anglais integrin-linked kinase
iNOS : oxyde nitrique synthase inducible, en anglais inducible nitric oxide synthase
IRM : imagerie par résonance magnétique
ITK : inhibiteur de tyrosine kinase

JCV : virus JC ou virus John Cunningham

KLRC1 : récepteur de lectine des NK de la sous-famille C et membre 1
KPS : performance status de Karnofsky, en anglais Karnofsky performance status

LAK : lymphocytes tueurs activés, en anglais lymphocyte-activated killer
LCR : liquide céphalo-rachidien
LIF : facteur inhibiteur de leucémie, en anglais leukemia inhibitory factor
LPS : lipopolysaccharide
LT : lymphocytes T
LTF : lactotransferrine
LTreg: lymphocytes T régulateurs

MBP : myelin basic protein
MDSC : cellules suppressives dérivées des myéloïdes, en anglais myeloid-derived suppressor cell
MGMT : O6-méthylguanine méthyl-transférase
MIF : facteur d'inhibition de la migration macrophagique, en anglais macrophage migration inhibitory factor
min : minute
MMP : métalloprotéase
MMR : système de réparation des mésappariements, en anglais mismatch repair
MMSE : examen de minimental test
MNX1 : protéine homéobox du motoneurone et du pancréas

N : normal
NAA : N-acétyl-L-aspartate
NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NCAM : molécule d'adhésion cellulaire neurale, en anglais neural cell adhesion molecule
NK : cellules tueuses, en anglais natural killer

OA : oligodendrogliome anaplasique
OAA : oligoastrocytome anaplasique
OMIT : observatoire inter-régional des médicaments et de l'innovation thérapeutique
OMS : organisation mondiale de la santé

PAM : partitioning around medoids
PBS : tampon phosphate salin, en anglais phosphate buffered saline
PCR: réaction de polymérisation en chaîne, en anglais polymerase chain reaction
PD-1 : programmed-cell death 1
PDGF : facteur de croissance dérivé des plaquettes, en anglais platelet derived growth factor
PDGFR: récepteur du PDGF
PD-L1 : ligand du PD-1
PI3K : phosphatidil-inositol-3 kinase
PGE2 : prostaglandine E2
PHA : phytohémagglutinine
PS : performance status
PTV : volume cible prévisionnel de traitement, en anglais planning target volume

RPA : classe de partitionnement, en anglais recursive partitioning analysis
RPS19 : protéine ribosomale 19 sous-unité 40S
RTOG : groupe américain d'oncologie radiothérapique, en anglais radiation therapy oncology group
RT Q-PCR : PCR après transcription inverse quantitative d'un acide ribonucléique en acide désoxyribonucléique complémentaire, en anglais reverse transcriptase polymérase chain reaction quantitative

s : similarité

SAA1 : protéine du sérum amyloïde A 1
SEER: organisme d'épidémiologie, en anglais : surveillance epidemiology and end results
SG : survie globale
SIGLEC 2 : sialic acid-binding Ig-like lectin
 α -SMA: actine des muscles lisses, en anglais α -smooth muscle actin
SNC : système nerveux central
SOM : self-organizing maps
SSP : survie sans progression
STAT1: signal de transduction et d'activation de transcription 1
STIC : soutien aux techniques innovantes et couteuses
SVF : sérum de veau fœtal

t : recouvrement topologique

TAM : macrophages associés aux tumeurs, en anglais tumour-associated macrophages
TAN : neutrophiles associés aux tumeurs, en anglais tumour-associated neutrophils
TBP : TATA box binding protein
TCGA : atlas du génome du cancer, en anglais the cancer genome atlas
TCR : récepteur cellulaire du lymphocyte T, en anglais T cell receptor
TEP : tomographie par émission de positrons
TGF : facteur de croissance de transformation, en anglais transforming growth factor
TGNM : tumeur glioneuronale maligne
TIL : lymphocytes infiltrant la tumeur, en anglais tumour infiltrating lymphocyte
TIMP-1 : inhibiteur de la MMP1, en anglais tissue inhibitor of MMP 1
TLR : récepteur de type toll, en anglais toll-like receptor
TNF α : facteur de nécrose tumorale α , en anglais tumor necrosis factor α
tPA: l'activateur tissulaire du plasminogène en anglais tissue-type plasminogene activator
TRAIL : TNF related apoptosis inducing ligand

uPA: urokinase activatrice du plasminogène, urokinase-type plasminogen activator en anglais

VCAM-1 : molécule d'adhésion cellulaire vasculaire 1, en anglais vascular cell adhesion molecule 1

VEGF : facteur de croissance endothelial vasculaire, en anglais vascular endothelium growth factor

WGCNA : weighted correlation network analysis

Analyse rétrospective de 24 glioblastomes récidivant après radiochimiothérapie concomitante et traités par nitrosourées ou par l'association irinotécan et bévacizumab

Retrospective analysis of 24 recurrent glioblastoma after chemoradiation and treated with nitrosoureas or irinotecan and bevacizumab

Élodie Vauleon^{1,2}, Habiba Mesbah³, Daniel Gedouin¹, Isabelle Lecouillard⁴, Guillaume Louvel⁴, Abderrahmane Hamlat⁵, Laurent Riffaud⁵, Béatrice Carsin⁶, Véronique Quillien^{2,7}, Odile Audrain³, Thierry Lesimple¹

¹ Centre Eugène-Marquis, département d'oncologie médicale, CS 44229, 35042 Rennes Cedex, France

² UMR 6061 CNRS, université de Rennes-I, IFR 140, CS34317, 35043 Rennes Cedex, France

³ Centre Eugène-Marquis, département d'information médicale, avenue Bataille-Flandres-Dunkerque, CS 44229, 35042 Rennes Cedex, France

<o.audrain@rennes.unicancer.fr>

⁴ Centre Eugène-Marquis, département de radiothérapie, CS 44229, 35042 Rennes Cedex, France

⁵ CHU Ponchaillou, département de neurochirurgie, 35033 Rennes, France

⁶ CHU Ponchaillou, département de radiologie, 35033 Rennes, France

⁷ Centre Eugène-Marquis, département de biologie, CS 44229, 35042 Rennes Cedex, France

Article reçu le 25 mai 2011,
accepté le 29 août 2011
Tirés à part : O. Audrain

Pour citer cet article : Vauleon É, Mesbah H, Gedouin D, Lecouillard I, Louvel G, Hamlat A, Riffaud L, Carsin B, Quillien V, Audrain O, Lesimple T. Analyse rétrospective de 24 glioblastomes récidivant après radiochimiothérapie concomitante et traités par nitrosourées ou par l'association irinotécan et bévacizumab. *Bull Cancer* 2012 ; 99 : 121-6.
doi : 10.1684/bdc.2011.1528.

Résumé. Malgré les progrès dans la prise en charge initiale du glioblastome (GB), la grande majorité des patients présenteront une récurrence dans les deux à trois ans. Le traitement médical de ces récurrences est en train d'être modifié par l'utilisation des traitements anti-angiogéniques. Vingt-quatre patients présentant un GB récidivant après radiochimiothérapie concomitante puis adjuvante par témozolomide ont été traités à Rennes par une chimiothérapie conventionnelle (nitrosourée) ou par l'association d'irinotécan et de bévacizumab. Dans cette analyse rétrospective, la survie globale à partir du diagnostic de récurrence était significativement plus longue chez les patients traités par l'association irinotécan et bévacizumab que par chimiothérapie conventionnelle (cinq mois *versus* 11,5 mois). L'association d'irinotécan et de bévacizumab a semblé apporter un bénéfice clinique aux patients présentant un GB en récurrence. ▲

Mots clés : glioblastome, récurrence, bévacizumab, irinotécan

Abstract. Despite progress in the initial management of glioblastoma (GB), the vast majority of patients will experience recurrence within 2-3 years. The medical treatment of these recurrences is being modified by the use of antiangiogenic therapies. Twenty-four patients, who relapsed from GB after chemoradiation followed by adjuvant temozolomide in Rennes, were treated by conventional chemotherapy (nitrosourea) or by the combination of irinotecan and bevacizumab. In this retrospective analysis, overall survival from diagnosis of recurrence was significantly longer in patients treated with the combination of bevacizumab and irinotecan than with nitrosourea (5 months *versus* 11,5 months). The combination of irinotecan and bevacizumab appeared to provide clinical benefit to patients with recurrent GB. ▲

Key words: glioblastoma, recurrence, bevacizumab, irinotecan

Introduction

Le glioblastome (GB) est la tumeur cérébrale primitive de l'adulte la plus fréquente et la plus grave [1].

Malgré les progrès récents dans la prise en charge thérapeutique des GB, la médiane de survie reste comprise entre 12 à 15 mois [2]. Depuis l'essai de Stupp et al., le traitement standard associe une exérèse chirurgicale la plus complète possible suivie d'une irradiation associée à une chimiothérapie concomitante puis adjuvante par témozolomide [2]. L'actualisation de cet essai de phase III a mis en évidence environ 10 % de longs survivants à cinq ans [3]. La grande majorité des patients présente ainsi une récurrence dont la prise en charge reste difficile, sans efficacité démontrée des traitements systémiques. Les essais de phase II publiés avec les nitrosourées (lomustine, carmustine, fotémustine), la procarbazine, le cisplatine ou l'irinotécan retrouvent un taux de réponse objective de 6 %, une survie sans récurrence à six mois de 15 % environ et une survie globale à partir de cette récurrence comprise entre trois à six mois [4].

D'autres approches thérapeutiques ont été essayées comme la chimiothérapie *in situ* [5, 6, 7], l'immunothérapie [8] ou l'utilisation de thérapies ciblées, qui agissent au niveau de la gliomagenèse [9]. Le GB, étant une tumeur hypervascularisée, l'inhibition de cette angiogenèse a un rationnel solide [10]. Le *vascular endothelial growth factor* (VEGF) est une cible thérapeutique de choix et son expression est un facteur pronostique péjoratif dans le GB [11]. Cette protéine est produite non seulement par la cellule tumorale, mais aussi par son environnement [12]. Une étude de phase II utilisant un alkylant, l'irinotécan, associé au bévécizumab – anticorps monoclonal humanisé anti-VEGF – a mis en évidence un taux de réponse objective élevé de 57 % et une survie globale à six mois de la récurrence de 77 % [13]. Cette étude prospective de phase II et plusieurs études rétrospectives ont permis l'obtention pour le bévécizumab aux États-Unis d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) dans le traitement du GB en récurrence. Ce traitement est actuellement une option thérapeutique des GB récidivants reconnus en Europe [14, 15], mais où le bévécizumab n'a pas obtenu son AMM dans cette indication.

Trois présentations au congrès européen de l'Esmo 2010 ont rapporté des séries rétrospectives multicentriques de patients traités en récurrence par cette association [16, 17, 18].

L'étude rétrospective rapportée ici analyse l'impact en termes de survie des patients porteurs d'un GB récidivant et traités par chimiothérapie conventionnelle ou par l'association d'irinotécan et de bévécizumab.

Patients et méthodes

Les patients âgés de plus de 18 ans, porteurs d'un glioblastome histologiquement prouvé et traités en récurrence après radiochimiothérapie concomitante et adjuvante par témozolomide, ont été analysés. Deux cohortes historiques traitées différemment sont étudiées. La première cohorte est une population traitée par chimiothérapie conventionnelle (premier cycle de traitement effectué entre le 6 septembre 2005 et le 2 novembre 2007) et la seconde cohorte est traitée par l'association d'irinotécan et de bévécizumab (premier cycle de traitement effectué entre le 15 novembre 2007 et le 22 octobre 2009).

L'objectif principal de cette étude rétrospective monocentrique de cohorte est d'analyser la survie à partir de la récurrence chez les patients traités par chimiothérapie conventionnelle ou par l'association d'irinotécan et de bévécizumab, définie comme le délai entre le diagnostic de récurrence et le décès ou les dernières nouvelles du patient.

Les objectifs secondaires sont l'analyse de la survie à six mois de la récurrence des deux populations de patients. Les toxicités de grade I à IV, décrites dans les dossiers, ont également été recueillies.

Résultats

Vingt-quatre patients vérifiant les critères d'inclusion et d'exclusion ont été analysés rétrospectivement. Douze patients ont reçu une chimiothérapie conventionnelle, majoritairement par nitrosourée ($n = 12$ dont dix par lomustine ou Bêlustine®, un par témozolomide ou Témodal® et un par carmustine ou Bicnu®) et 12 patients ont reçu une association d'irinotécan ou Campto® (340 ou 125 mg/m² en fonction de l'existence ou non d'un traitement concomitant par antiépileptique inducteur enzymatique) et de bévécizumab ou Avastin® (10 mg/kg) tous les 14 jours en perfusion intraveineuse.

Les caractéristiques des deux groupes étaient comparables à l'exception de l'âge moyen, significativement plus faible dans le groupe irinotécan et bévécizumab (tableau 1). Cette différence était prévisible, l'association ayant d'abord été proposée

essentiellement chez les sujets jeunes après les résultats préliminaires de l'étude de Vredenburgh *et al.* en 2007 [13], avant que l'indication ne soit secondairement élargie à l'ensemble des patients ne présentant pas de contre-indication.

L'arrêt du traitement a été motivé par une progression tumorale chez l'ensemble des patients traités par chimiothérapie conventionnelle et chez neuf des 12 patients du bras irinotécan et bévaccizumab. Un patient a arrêté l'association irinotécan et bévaccizumab à cause d'une toxicité cardiovasculaire et deux autres patients devant une stabilité clinique et radiologique (tableau 2).

Un patient traité par lomustine a eu une toxicité hématologique plaquettaire de grade IV, deux une toxicité de grade III et un de grade II. Trois adaptations de dose ont été nécessaires. Deux patients traités par l'association irinotécan et bévaccizumab ont eu une adaptation de dose suite à un amaigrissement et à l'introduction d'un traitement antiépileptique inducteur enzymatique. Aucune toxicité hématologique ou non de grade I, II ou III n'a été décrite dans les dossiers des patients traités par l'association irinotécan et bévaccizumab. Un patient a présenté deux épisodes d'accident ischémique transitoire ayant entraîné l'arrêt du traitement après obtention d'une réponse clinique et radiologique (six cycles au total) (tableau 2).

Deux patients traités par chimiothérapie conventionnelle ont été traités par une seconde ligne de traitement

(lomustine et carboplatine) et trois patients traités par l'association d'irinotécan et bévaccizumab ont été traités ensuite par bévaccizumab en monothérapie, ou témozolomide ou carmustine (tableau 2). Les autres patients ont bénéficié d'une prise en charge uniquement palliative.

La médiane de survie à partir de la récurrence était statistiquement différente : cinq mois et 11,5 mois respectivement dans la cohorte traitée par chimiothérapie conventionnelle et dans la cohorte traitée par l'association irinotécan et bévaccizumab ($p = 0,02$) (figure 1). La survie médiane à partir du premier jour de traitement était également statistiquement différente entre les deux groupes : 4,5 mois dans la cohorte traitée par chimiothérapie conventionnelle *versus* 9,5 mois dans la cohorte traitée par irinotécan et bévaccizumab ($p = 0,03$).

La survie à six mois du diagnostic de récurrence était de 42 % dans la cohorte traitée par chimiothérapie conventionnelle *versus* 100 % dans la cohorte traitée par irinotécan et bévaccizumab ($p = 0,02$).

Compte-tenu de la différence d'âge entre les deux groupes, une analyse des sous-groupes des patients âgés de moins de 50 ans ($n = 10$, trois traités par chimiothérapie conventionnelle et sept par irinotécan et bévaccizumab) et de 50 ans et plus ($n = 14$, neuf traités par chimiothérapie conventionnelle et cinq par irinotécan et bévaccizumab) a été réalisée. La survie médiane à partir de la récurrence n'était pas statistiquement

Tableau 1. Comparabilité des groupes de patients traités par chimiothérapie conventionnelle ou association irinotécan et bévaccizumab.

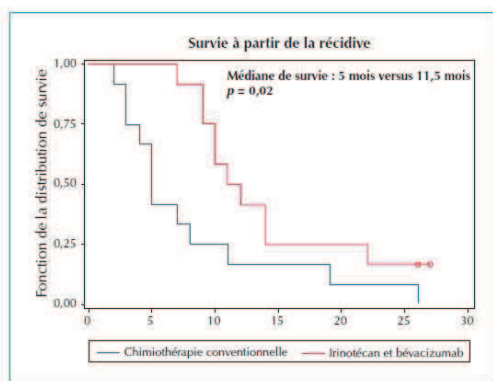
	Chimiothérapie conventionnelle	Irinotécan et bévaccizumab	<i>p</i>
Effectif	12	12	
Âge moyen [âge minimal-âge maximal]	56 ans [30-69]	44 ans [28-55]	0,008
Sexe masculin/féminin	9/3	8/4	NS
Type de chirurgie initiale			
Complète	6	6	NS
Subtotale	3	6	
Biopsie	3	0	
IK à récurrence < ou ≥ 70 %	1/11	1/11	NS
Délai moyen récurrence [délai minimal-délai maximal]	10 mois [5-19]	9,9 mois [6-20]	NS
Chirurgie à récurrence ou non	1/11	1/11	NS

IK : indice de Karnofsky.

Tableau 2. Modalités et toxicités des traitements reçus dans les deux cohortes.

	Chimiothérapie conventionnelle	Irinotécan et bévacizumab
Effectif	12	12
Nb moyen de cycles [minimum-maximum]	3 [1-9]	17 [4-33]
Traitements reçus Nb patients type traitement (nb cycles, intercure)	10 lomustine (1-9 cycles, 6 sem) 1 témozolomide (5 cycles, 4 sem) 1 carmustine (2 cycles, 3 sem)	17 irinotécan bévacizumab (4-33 cycles, 2 sem)
Causes d'arrêt du traitement		
Progression tumorale	12	9
Stabilité tumorale	0	2
Toxicité	0	1
Traitement ultérieur		
Soins palliatifs	10	8
Pas de traitement	0	1
Chimiothérapie	2	3
Nb patients type (nb cycles)	1 lomustine (1 cycle) 1 carboplatine (11 cycles)	1 témozolomide (2 cycles) 1 carmustine (5 cycles) 1 bévacizumab (15 cycles)
Toxicité		
Grade I	0	0
Grade II	1	0
Grade III	2	0
Grade IV	1	1
Adaptation de posologie		
Nb patients	3	2
Cause	Thrombopénie : 3	Amaigrissement : 1 Antiépileptique : 1

Nb : nombre ; sem : semaines ; NS : non statistiquement significatif.

**Figure 1.** Survie à partir de la récurrence en fonction des traitements.

différente chez les sujets âgés de moins de 50 ans ou chez les patients âgés de 50 ans et plus (sept mois *versus* 12 mois et cinq mois *versus* neuf mois dans la cohorte traitée par chimiothérapie conventionnelle et dans la cohorte traitée par irinotécan et bévacizumab respectivement), mais les effectifs des sous-groupes étaient faibles.

Discussion

Cette étude rétrospective monocentrique de cohorte permet d'évaluer la prise en charge des récurrences de glioblastome par l'association d'irinotécan et bévacizumab et son impact sur la survie.

L'effectif de notre analyse rétrospective est faible, mais celle-ci est le reflet de notre pratique clinique.

Certains patients ont été exclus de l'étude pour avoir reçu une radiochimiothérapie concomitante avec un autre médicament que le témozolomide avant la publication de Stupp *et al.* [3]. De plus, chez certains patients, l'indication d'une seconde ligne de traitement n'a pas été retenue du fait de l'aggravation neurologique pendant ou rapidement après le témozolomide adjuvant ou du fait de l'altération franche de l'état général contre-indiquant la mise en route d'une chimiothérapie. La majorité des patients analysés ont ainsi un bon état général avec un indice de Karnofsky supérieur à 70 %. Enfin, les données préliminaires d'efficacité de l'association d'irinotécan et de bévécizumab n'ont amené un changement d'indication thérapeutique que secondairement du fait de l'absence d'AMM. L'observatoire des médicaments et innovations thérapeutiques (Omit) de Bretagne et Pays de Loire, créée en 2003, a autorisé, après approbation du comité scientifique fin 2007, l'utilisation de cette association thérapeutique et donc l'élargissement de l'indication à l'ensemble des patients présentant une récurrence de glioblastome sans contre-indication. Cela ne permet pas d'augmenter l'effectif de cette étude de cohorte, notamment des patients non traités par l'association d'irinotécan et de bévécizumab sans introduire un biais de sélection.

Plusieurs biais influencent les résultats de cette étude notamment un biais de recrutement avec des patients traités par l'association d'irinotécan et de bévécizumab, qui sont plus jeunes dans notre cohorte avec donc probablement moins de co-morbidités. Cependant, il faut noter que la survie à partir de la récurrence n'est pas significativement supérieure dans le sous-groupe de patients âgés de moins de 50 ans traités par l'association d'irinotécan et de bévécizumab par rapport à une chimiothérapie conventionnelle.

Aucun patient inclus dans notre étude de cohorte n'a plus de 70 ans, en effet, d'une part, la plupart des patients âgés de plus de 65 ans étaient inclus à l'époque dans un essai européen NORDIC spécifique du sujet âgé. Ils n'ont donc pas bénéficié d'une radiochimiothérapie concomitante nécessaire pour l'inclusion dans notre étude de cohorte. D'autre part, les patients âgés de plus de 70 ans, traités par radiochimiothérapie concomitante et adjuvante par témozolomide, qui présentent une récurrence ne reçoivent pas toujours une autre chimiothérapie, mais bénéficient parfois d'une prise en charge uniquement palliative.

La tolérance de l'association d'irinotécan et de bévécizumab est bonne avec une seule toxicité de grade III-IV rapportée, liée là aussi probablement à la présélection des patients.

Cette analyse rétrospective va dans le sens d'une supériorité en termes de bénéfice clinique de l'association d'irinotécan et de bévécizumab sur la chimiothérapie conventionnelle. La survie à partir de la récurrence est supérieure chez les patients traités par irinotécan et bévécizumab, incitant à proposer cette association en l'absence de contre-indication.

Des publications récentes posent la question de l'administration de bévécizumab en monothérapie [14, 19, 20] ou associé à d'autres molécules, chimiothérapies ou thérapies ciblées, voire de l'intérêt de son introduction plus précoce en situation adjuvante. Enfin, la demande pour l'obtention de l'AMM du bévécizumab dans cette indication en France est en cours. ▼

Conflits d'intérêts : aucun.

Références

1. Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med* 2008 ; 359 : 492-507.
2. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, *et al.* Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005 ; 352 : 987-96.
3. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, *et al.* Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol* 2009 ; 10 : 459-66.
4. Wong ET, Hess KR, Gleason MJ, *et al.* Outcomes and prognostic factors in recurrent glioma patients enrolled onto phase II clinical trials. *J Clin Oncol* 1999 ; 17 : 2572-8.
5. Balossier A, Dörner L, Emery E, *et al.* Incorporating BCNU wafers into malignant glioma treatment: European case studies. *Clin Drug Invest* 2010 ; 30 : 195-204.
6. Metellus P, Coulbaly B, Nanni I, *et al.* Prognostic impact of O6-methylguanine-DNA methyltransferase silencing in patients with recurrent glioblastoma multiforme who undergo surgery and carmustine wafer implantation: a prospective patient cohort. *Cancer* 2009 ; 115 : 4783-94.
7. Westphal M, Ram Z, Riddle V, Hilt D, Bortey E. Gliadel wafer in initial surgery for malignant glioma: long-term follow-up of a multicenter controlled trial. *Acta Neurochir (Wien)* 2006 ; 148 : 269-75.
8. Vauleon E, Avril T, Collet B, Mosser J, Quillien V. Overview of cellular immunotherapy for patients with glioblastoma. *Clin Dev Immunol* 2010 ; 2010 (doi:10.1155/2010/689171).
9. de Boudard S, Guillemau JS. Angiogenèse et stratégies anti-angiogéniques des glioblastomes. *Bull Cancer* 2005 ; 92 : 360-72.
10. Jain RK, di TE, Duda DG, Loeffler JS, Sorensen AG, Batchelor TT. Angiogenesis in brain tumours. *Nat Rev Neurosci* 2007 ; 8 : 610-22.
11. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003 ; 9 : 669-76.
12. Lamszus K, Ulbricht U, Matschke J, Brockmann MA, Fillbrandt R, Westphal M. Levels of soluble vascular endothelial growth factor

(VEGF) receptor 1 in astrocytic tumors and its relation to malignancy, vascularity, and VEGF-A. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 1399-405.

13. Vredenburgh JJ, Desjardins A, Herndon JE, et al. Bevacizumab plus irinotecan in recurrent glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol* 2007; 25: 4722-9.

14. Chamberlain MC, Johnston SK. Salvage therapy with single agent bevacizumab for recurrent glioblastoma. *J Neurooncol* 2010; 96: 259-69.

15. Ducray F, Dutertre G, Ricard D, Gontier E, Idhah A, Massard C. Actualités dans la biologie, l'imagerie et le traitement des gliomes de l'adulte. *Bull Cancer* 2010; 97: 17-36.

16. Grudé F, Campone M, Soulié P, et al. Bevacizumab and irinotecan in recurrent malignant glioma: results of a French retrospective cohort study OMIT of 264 patients in real practice! Abstract of the 35th ESMO Congress Milan, Italy 8-12 October 2010. *Ann Oncol* 2010; 21: 1058P.

17. Hofer S, Elandt K, Greil R, et al. Encouraging overall survival (OS) with bevacizumab (BEV) in patients with recurrent high-grade glioma (HGG) treated outside clinical trials. Abstract of the 35th ESMO Congress Milan, Italy 8-12 October 2010. *Ann Oncol* 2010; 21: 1057P.

18. Taillibert S, Hoang-Xuan K, Guiu S, et al. Bevacizumab (B) with irinotecan in recurrent glioblastoma (GBM): a National retrospective cohort of the ANOCEF (Association des neuro-oncologues d'expression française) Group. Abstract of the 35th ESMO Congress Milan, Italy 8-12 October 2010. *Ann Oncol* 2010; 21: 1056P.

19. Friedman HS, Prados MD, Wen PY, et al. Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol* 2009; 27: 4733-40.

20. Kreisl TN, Kim L, Moore K, et al. Phase II trial of single-agent bevacizumab followed by bevacizumab plus irinotecan at tumor progression in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol* 2009; 27: 740-5.

Intérêt de la MGMT dans les gliomes

MGMT analysis in gliomas

Véronique Quillien^{1,2}, Élodie Vauléon^{1,2}, Stephan Saikali³, Thierry Lesimple¹, Abderrahmane Hamlat³, Amandine Etcheverry^{2,4}, Jean Mosser^{2,3,4}

¹ CRLCC Eugène-Marquis, 35 000 Rennes, France

<v.quillien@rennes.fnclcc.fr>

² CNRS UMR 6061, Équipe génétique et développement, 35 000 Rennes, France

³ CHU de Rennes, 35 000 Rennes, France

⁴ Plate-forme transcriptome Biogenouest®, 35 000 Rennes, France

Tirés à part : V. Quillien

Pour citer cet article : Quillien V, Vauléon É, Saikali S, Lesimple T, Hamlat A, Etcheverry A, Mosser J. Intérêt de la MGMT dans les gliomes. *Bull Cancer* 2011 ; 98 : 291-303.
 doi : 10.1684/bdc.2011.1332.

Résumé. Il est maintenant bien établi que le statut MGMT est un facteur prédictif de réponse au traitement standard des glioblastomes, qui comprend de la radiothérapie et du témozolomide (TMZ). La méthylation du promoteur *MGMT* est d'autre part un facteur pronostique – indépendant du traitement – dans les gliomes anaplasiques. La fonction prédictive peut s'expliquer par le rôle de l'enzyme de réparation MGMT qui contrecarre l'action des agents alkylants dont fait partie le TMZ. La méthylation du promoteur *MGMT* pourrait également être le reflet d'un phénotype moléculaire particulier ayant une signification pronostique propre. À l'heure où la détermination du statut MGMT devient incontournable lors de la mise en place de nouveaux essais thérapeutiques dans les gliomes et où elle commence à être utilisée dans la pratique quotidienne, il devient urgent de déterminer la meilleure technique d'analyse. Une étude multicentrique française a été mise en place afin de répondre à cette question. ▲

Abstract. MGMT status is now regarded as a strong predictive factor of response to standard treatment of newly diagnosed glioblastomas involving temozolomide (TMZ) and radiotherapy. *MGMT* promoter methylation is also a prognostic factor – independent of treatment – in anaplastic gliomas. The predictive function can be explained by the role of the DNA repair enzyme MGMT, which antagonizes the effects of alkylating agents such as TMZ. *MGMT* promoter methylation could also reflect a particular molecular phenotype with its own specific prognostic significance. Since MGMT status determination is becoming a crucial biological marker in new clinical glioma trials, and is beginning to be used in day-to-day clinical practice, there is currently a strong need to determine the best technique for MGMT analysis. A French multicenter study has been set up for this purpose. ▲

Mots clés : MGMT, gliomes, facteur pronostique, facteur prédictif

Key words: MGMT, gliomas, prognostic factor, predictive factor

Le gène O⁶-méthylguanine-DNA méthyltransférase (*MGMT*) situé en 10q26, code pour la protéine de réparation MGMT, encore appelée O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransférase (AGT). Cette enzyme a pour fonction de surveiller l'ADN en éliminant les groupements alkyls trouvés en position O⁶ sur les guanines et, dans une moindre mesure, ceux situés en position O⁴ sur les thymines. Après transfert des groupements alkyls vers le site actif de la protéine, celle-ci est détruite par le protéasome : la capacité de réparation de la cellule dépend donc de la quantité d'enzyme active au niveau de son noyau et des possibilités de production de l'enzyme. La MGMT est exprimée par de nombreux

tissus non tumoraux, tels le foie, les poumons, les reins ou encore le système hématopoïétique. La présence de la MGMT dans les cellules normales permet de les protéger vis-à-vis des carcinogènes exogènes. Dans les tumeurs, l'expression de la MGMT est variable et des études sur lignée cellulaire ont montré que les agents alkylants sont efficaces en l'absence de MGMT et lorsque le système MMR est actif [1] (figure 1). Un des systèmes d'échappement observé dans la cellule tumorale, et documenté dans les gliomes, est l'apparition de mutations au niveau des enzymes du système MMR, notamment MSH6. Les mutations de MSH6 ne sont jamais détectées dans des prélèvements de

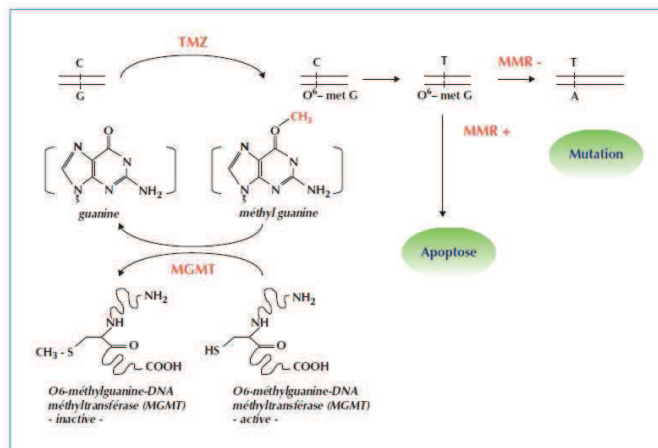


Figure 1. Mode d'action de l'enzyme O⁶-méthylguanine méthyltransférase (MGMT) et du témozolomide (TMZ) au niveau cellulaire. Le TMZ ajoute des groupements de type alkyl au niveau de l'ADN, notamment des groupements méthyles au niveau des guanines. Si la cellule ne contient pas de MGMT, la guanine méthylée va s'apparier à une thymine lors de la duplication de l'ADN, ce qui va être reconnu comme une erreur et activer le système MMR (*mismatch repair*). L'inefficacité de la réparation va aboutir à l'apoptose cellulaire. En cas de système MMR inactif, lors de la réplication la thymine va s'apparier à une adénine, d'où l'apparition de mutations de type GC vers AT. S'il y a de la MGMT dans la cellule, l'enzyme va permettre à la guanine méthylée de retrouver son état natif et va donc ainsi contrecarrer l'action du TMZ.

glioblastomes (GBM) avant traitement. En revanche, environ un quart des GBM en rechute ayant été traités par des agents alkylants présentent de telles mutations. Ces mutations s'inscrivent dans le cadre de l'apparition d'un phénotype « hypermutant », observé notamment chez des patients initialement répondeurs aux agents alkylants car n'exprimant pas la MGMT, et caractérisé par l'apparition de nombreuses mutations de type transition G-C vers A-T, notamment au niveau d'îlots CpC [2, 3].

Différentes équipes se sont intéressées à la MGMT comme facteur prédictif potentiel de réponse aux agents alkylants, drogues fréquemment utilisées dans le traitement des gliomes. De nombreuses études ont maintenant montré l'intérêt de ce marqueur pour prévoir la réponse des patients atteints d'un GBM traités en première intention par l'association de témozolomide (TMZ) et d'une radiothérapie (RT). La méthylation du promoteur du gène *MGMT*, méthode fréquemment utilisée pour déterminer le statut MGMT, aurait de plus un intérêt pronostique dans les gliomes de haut grade, qui ne serait en aucun cas lié à la réponse aux agents alkylants, et qui pourrait être le reflet d'un phénotype moléculaire particulier.

Différents moyens d'étude de la MGMT

Différentes approches peuvent être utilisées pour rechercher l'expression de la MGMT au sein d'un tissu.

Détection de l'activité enzymatique de la MGMT

La détection de l'activité enzymatique MGMT, par quantification du transfert d'un groupement méthyl radioactif d'un substrat ADN vers la protéine a surtout été utilisée dans les années 1990. Des techniques utilisant des marquages fluorescents et non plus radioactifs ont récemment été mises au point. Cette technique présente l'avantage d'être une analyse fonctionnelle, en revanche elle est fastidieuse et donc difficilement envisageable dans la pratique quotidienne. D'autre part, l'activité MGMT mesurée peut potentiellement provenir des cellules non tumorales contaminant la tumeur, notamment les cellules hématopoïétiques et les cellules endothéliales. Par ce type d'approche, environ 20 % des glioblastomes ne présentent pas d'activité MGMT avant traitement et deux études ont montré une augmentation d'activité dans les tumeurs en récurrence, après

traitement par des agents alkylants [4, 5]. Aucune étude n'a cependant montré de lien formel entre la mesure de l'activité MGMT dans les tumeurs et la réponse au traitement ; il semble donc préférable de réserver ce type d'approche à des études fondamentales sur des modèles de type lignée cellulaire.

Mise en évidence de la protéine par immunohistochimie

La mise en évidence de la protéine MGMT peut se faire par immunohistochimie (IHC), une technique relativement simple et facile à mettre en place dans les services d'anatomie pathologique. Théoriquement, il est possible de ne compter que la positivité observée au niveau des cellules tumorales. Cependant, différentes cellules non tumorales (cellules endothéliales, cellules hématopoïétiques) peuvent naturellement exprimer la protéine MGMT et être à tort considérées comme tumorales en lecture immunohistochimique, ce qui entraîne un risque de surestimation du pourcentage de cellules tumorales positives [6, 7]. Cela incite certains pathologistes à étudier sur la même coupe histologique le pourcentage des cellules CD68 positives (marqueur histiocytaire) lors de l'interprétation des résultats d'immunohistochimie [8, 9]. De plus l'identification des cellules tumorales positives s'avère difficile dans certains cas et pose le problème de la reproductibilité de la lecture entre pathologistes [10]. Les seuils utilisés pour différencier les échantillons « négatifs » des « positifs » varient de 5 % de cellules positives à 35 %.

Analyse de l'expression de l'ARNm

L'expression de la MGMT peut être recherchée au niveau de l'ARNm. Les résultats de la littérature sont contrastés concernant le lien entre l'expression ARN de la MGMT et la survie des patients traités par des agents alkylants. Deux études récentes ont analysé en parallèle l'expression de l'ARNm de la MGMT et la méthylation du promoteur de la MGMT sur une même série d'échantillons de GBMs traités par le schéma standard comprenant du TMZ. Dans les deux cas, les résultats de l'analyse de la méthylation du promoteur sont bien supérieurs à ceux obtenus par l'analyse de l'ARNm [8, 11]. Les problèmes majeurs de ce type d'analyse sont, d'une part, le fait de l'expression de la MGMT par les cellules non tumorales et, d'autre part, la difficulté de fixer un seuil clinique décisionnel.

Analyse de la méthylation du promoteur

Il existe au niveau des régions promotrices de nombreux gènes des îlots CpG dont les bases cytosines peuvent être méthylées et ainsi participer à la régulation de la transcription. Pour le gène *MGMT*, l'îlot est constitué de 97 CpG, qui sont normalement non méthylés dans les tissus non tumoraux. Dans les tumeurs, et notamment les gliomes, la plupart des sites de l'îlot CpG peuvent être méthylés, de manière variable d'un CpG à l'autre et d'une tumeur à l'autre [12, 13]. La plupart des méthodes d'études de la méthylation du promoteur s'intéressent aux CpG situés en partie dans l'exon 1 du gène (CpG 70-CpG90), une région pour laquelle il a été montré une bonne corrélation entre la méthylation et la perte d'expression du gène analysée au niveau de l'ARNm [12].

La technique la plus ancienne pour l'étude de la méthylation est la MS-PCR (*methyl specific-polymerase chain reaction*). L'ADN est tout d'abord converti chimiquement par traitement au bisulfite, ce qui permet de convertir les cytosines non méthylées en uraciles alors que les cytosines méthylées sont préservées. Cela permet de différencier les brins méthylés des brins non méthylés, après amplification par PCR en utilisant des amorces spécifiques des 2 brins. Le résultat est rendu qualitativement, suivant les bandes observées. La spécificité de la technique tient donc au choix des amorces, qui vont s'apparier si les 6 à 10 sites concernés sont méthylés ou non méthylés. Il existe une variante dite PCR nichée, pour laquelle une première PCR amplifie sans discriminer selon le degré de méthylation, ce qui permet d'augmenter la sensibilité de la technique. Un des inconvénients de la MS-PCR réside dans la lecture du résultat sur gel, ce qui laisse place à la subjectivité. D'autre part, il existe un risque théorique de mauvaise fixation des amorces en cas de méthylation non uniforme des sites CpG. D'autres techniques ont été développées, qui débutent toutes par une phase de bisulfitation de l'échantillon, hormis la technique MS-MPLA. Les techniques les plus fréquemment rencontrées sont celles dérivées de la technique MS-PCR : la PCR est effectuée en temps réel et généralement le résultat de méthylation obtenu pour la *MGMT* est normalisé au résultat obtenu pour un gène de ménage. Une quantification peut être obtenue en effectuant en parallèle des courbes de calibration pour le gène d'intérêt et le gène de ménage. C'est ce type de technique qui a été développé par la société OncoMethylome et qui

est actuellement utilisé dans la plupart des essais européens et internationaux [14]. Par rapport à la MS-PCR classique, cette technique présente l'avantage d'une plus grande reproductibilité, en revanche elle ne permet pas de s'affranchir des problèmes éventuels de mauvais appariement des amorces et la normalisation entraîne un risque de sous-estimation du résultat en cas de contamination par des cellules non tumorales ou d'amplification génique du gène de ménage (cas de la bêta actine située en 7 p et fréquemment utilisée). D'autre part, le résultat étant rendu de manière quantitative, elle nécessite la détermination d'un seuil. Ce type de technique peut être rendu plus spécifique en utilisant en plus une sonde à hydrolyse spécifique, c'est le cas de la technique MethyLight testant une douzaine de sites CpG. Elle possède les mêmes avantages et inconvénients que la technique précédente.

Le pyroséquençage permet l'analyse du pourcentage de méthylation de différents îlots CpG. Il existe un kit commercial qui permet l'étude de 5 sites CpG (Quia-gen), 3 d'entre eux étant communs avec ceux reconnus dans la plupart des analyses de type MSP. Cette technique est bien reproductible et possède l'avantage de tenir compte de l'hétérogénéité de méthylation. Elle nécessite, en revanche, le recours à un pyroséquenceur, appareil beaucoup moins répandu que les appareils de PCR en temps réel. D'autre part, un seuil permettant d'identifier les échantillons positifs des négatifs reste à définir.

Les autres techniques développées pour évaluer la méthylation du gène *MGMT*, telles les techniques COBRA (*combined bisulfite restriction analysis*), ms-hrm (*methylation sensitive-high resolution melting*) ou ms-mpl (*methylation specific multiplex ligation-dependent probe amplification*) restent encore assez peu utilisées.

Corrélation entre les différentes techniques de dosage

Différentes études sur des lignées cellulaires ont montré un lien direct entre la méthylation du promoteur de la *MGMT* et l'absence d'expression du gène ou de la protéine. On pourrait donc s'attendre à une bonne corrélation entre les différentes techniques d'analyses, ce qui n'est pas le cas. Si on compare par exemple les résultats obtenus par technique MS-PCR avec ceux obtenus par IHC dans différentes études, en moyenne 63 % des échan-

tillons sont classés de manière identique par les deux techniques (i.e. absence d'expression protéique en présence d'un promoteur méthylé et expression protéique en présence d'un promoteur non méthylé). Pour le moment, on ne sait pas si cette différence est due à un problème méthodologique de l'une ou de l'autre des techniques ou à une réalité physiologique, les deux phénomènes observés étant différents. Il a été démontré dans des systèmes de lignée cellulaire que la radiothérapie, les corticoïdes, la présence de la protéine P53 ou encore l'activation du système NF- κ B pouvaient induire l'expression de *MGMT*, même en présence d'un promoteur méthylé. La différence observée pourrait donc être le reflet d'un niveau de régulation de la *MGMT* indépendant de celui de la méthylation du promoteur. Pour le moment c'est l'étude de la méthylation qui donne de manière la plus reproductible des résultats corrélés avec la clinique. Si la différence observée entre l'IHC et les techniques de type MS-PCR est purement méthodologique, on devrait au mieux réussir à avoir des résultats comparables avec les deux techniques. Sinon, les résultats des deux techniques pourraient être complémentaires.

Statut *MGMT* dans les gliomes

Gliomes avec une composante oligodendrogliale

Environ 70 % des gliomes avec une composante oligodendrogliale ont une méthylation du promoteur *MGMT*, indépendamment du grade histologique (figure 2). Les résultats d'expression protéique sont plus difficiles à interpréter, étant donné les différents seuils utilisés. Suivant les études, de 44 à 100 % des échantillons sont considérés comme n'exprimant pas ou exprimant faiblement la protéine *MGMT*. La plupart des études observent une corrélation entre la méthylation du promoteur *MGMT* et la perte d'hétérozygotie en 1p19q. Environ 90 % des gliomes avec une composante oligodendrogliale et ayant une LOH 1p19q sont méthylés [15-19].

Gliomes sans composante oligodendrogliale

Les astrocytomes et les GBMs présentent une méthylation de *MGMT* dans environ la moitié des cas (figure 2). Ces pourcentages restent à consolider pour les gliomes de bas grades et les gliomes anaplasiques étant donné

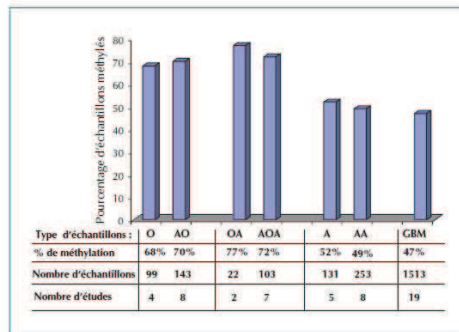


Figure 2. pourcentage de tumeurs ayant un promoteur de la MGMT méthylé, suivant l'histologie (O : oligodendrogliome ; AO : oligodendrogliome anaplasique ; OA : oligoastrocytome ; AOA : oligoastrocytome anaplasique ; A : astrocytome ; AA : astrocytome anaplasique ; GBM : glioblastome). Chaque calcul a été réalisé à partir des résultats recensés dans la littérature, dans différentes études.

qu'ils sont calculés à partir d'un nombre relativement restreint de patients ; en revanche les données sont disponibles pour plus de 1 500 GBM. Les astrocytomes diffus et anaplasiques sont caractérisés par une fréquence importante de tumeurs présentant des mutations de P53. Il existe une corrélation positive entre la présence de ces mutations et la présence d'un promoteur *MGMT* muté. En revanche, aucune corrélation n'est trouvée pour les GBM.

L'hétérogénéité tumorale, un problème ?

Les gliomes de haut grade, notamment les GBMs étant considérés comme des tumeurs très hétérogènes, il est légitime de s'interroger sur l'homogénéité des résultats d'une analyse *MGMT* effectuée à différents endroits d'une même tumeur. Afin de répondre à cette question, Grason-Frodl *et al.* ont effectué de 2 à 4 biopsies stéréotaxiques situées en moyenne à 10 mm de distance chez 18 patients atteints d'un GBM et 7 patients atteints d'un astrocytome anaplasique [20]. Ils rapportent une homogénéité dans les résultats d'analyse du promoteur *MGMT* au sein d'une tumeur qui est confirmée par deux autres études effectuées respectivement sur 12 et 7 GBM [21, 22]. L'étude de Dunn *et al.* trouve en revanche que 14 % des 93 échantillons de GBM analysés par pyroséquençage donnent des résultats discordants quand plusieurs prélèvements sont analysés. Dans la plupart des cas (9/13), la discordance a consisté en l'obtention d'un résultat négatif pour un prélèvement

à type de smear ou étalement cellulaire (prélèvement assez inhabituel pour ce type d'analyse), alors que le prélèvement usuel (biopsie ou histologie) s'est avéré positif [23]. Le résultat de ces études démontre donc que l'hétérogénéité tumorale ne serait pas un facteur limitant pour l'analyse de la *MGMT*.

Intérêt clinique de la détermination du statut *MGMT*

Dans les gliomes de bas grade

Quelques études, sur des nombres de patients restreints, ont cherché à savoir si la détermination du statut *MGMT* dans la tumeur initiale pouvait avoir un intérêt pronostique (tableau 1). Deux études chez des patients présentant un astrocytome de bas grade aboutissent à des conclusions inverses, à savoir une plus grande fréquence de progression sous forme maligne en l'absence de la protéine *MGMT* dans un cas [24] et une fréquence plus importante, associée à une survie après la progression plus courte pour les patients avec un promoteur non méthylé dans l'autre cas [25]. Il est important de noter que sur une cohorte de patients traités de manière identique, cette dernière équipe avait préalablement rapporté une survie sans récurrence (SSR) plus longue en cas de non méthylation du promoteur [26]. L'intérêt éventuel de la détermination de la *MGMT* dans ce contexte reste donc largement à préciser... Dans le cadre d'un traitement initial par TMZ, deux études montrent une meilleure survie en cas de méthylation du promoteur *MGMT* [27, 28].

Dans les gliomes anaplasiques

Deux études randomisées de phases III ont permis de clarifier l'intérêt pronostique de *MGMT* dans les gliomes anaplasiques. En effet, les précédentes études avaient conclu tantôt à un lien entre le statut *MGMT* et la survie [29–31], tantôt à l'absence de lien [18, 32, 33] chez des patients traités initialement ou lors de la rechute par des agents alkylants (tableau 2). L'essai NOA-04 qui a comparé une radiothérapie à un traitement PCV (procarbazine + CCNU + vincristine) ou TMZ en première ligne chez des patients atteints d'un gliome anaplasique (astrocytomes anaplasiques [AA], oligodendrogliome anaplasique [AO] ou oligoastrocytome anaplasique [AOA]) montre que la méthylation du promoteur *MGMT* est liée à une meilleure survie sans récurrence, quelle que soit la modalité de traitement. En analyse multivariée, le statut *MGMT* reste

Tableau 1. Études ayant analysé le lien entre le statut MGMT et le devenir clinique de patients atteints d'un gliome de bas grade.

Étude	Types histologiques	Fréquence de méthylation	Fréquence de résultats négatifs en IH	Lien avec la clinique	Traitement initial
Kesari <i>et al.</i> (2009)	A et O et OA (initiaux ou rechutes)	46 % (12/26)* 6/26 non informatifs		Meilleure survie globale pour les patients avec promoteur méthylé (sur 20 patients ayant un résultat informatif).	TMZ à 75 mg/m ² /j sur 49 j.
Watanabe <i>et al.</i> (2007)	A	63 % (17/27)		Meilleure médiane de survie après rechute pour les patients avec promoteur méthylé.	
Nakasu <i>et al.</i> (2007)	A		32 % (9/28) Seuil à 10 %	Taux de transformation maligne à 5 ans plus fort si IH négative. Pas de lien avec la survie globale.	
Everhard <i>et al.</i> (2006)	A O OA	(7/8) 93 % (39/42) (17/18)		Meilleure survie sans récurrence pour les patients avec promoteur méthylé.	TMZ.
Komine <i>et al.</i> (2003)	A	43 % (21/49)		Moins bonne survie sans récurrence pour les patients avec promoteur méthylé.	Traitements divers.

A : astrocytome ; O : oligodendrogliome ; OA : oligoastrocytome ; TMZ : témozolomide.

* : Technique Oncométhylome.

d'intérêt pronostique, avec le type histologique, IDH1, 1p19q et l'étendue de la résection (une composante oligodendrogliale, la présence d'une mutation IDH1, la méthylation du promoteur *MGMT* et la codélétion 1p19q étant liées à une meilleure SSR) [19]. Dans l'étude EORTC 26951 (AO et AOA) ; la présence d'une méthylation du promoteur est également de meilleur pronostic pour le groupe ayant de la radiothérapie seule ou de la radiothérapie associée à la chimiothérapie (PCV) [17]. En analyse multivariée, que ce soit pour la survie globale ou la survie sans récurrence, la présence d'une mutation IDH1 et la délétion 1p19q sont des facteurs pronostiques indépendants [34]. Ces résultats interrogent sur le rôle joué par la méthylation de *MGMT* au sein de ces tumeurs. Dans les GBMs nouvellement diagnostiqués, il existe clairement un lien entre la réponse au TMZ et le statut MGMT, qui permet

de parler de facteur prédictif de réponse au traitement. Dans les gliomes anaplasiques, le statut MGMT serait donc plutôt un facteur pronostique, indépendant du traitement (du moins des traitements testés lors de ces essais). Cela est cependant à moduler : dans l'étude EORTC 26951, les patients présentant un promoteur méthylé et traités par RT et PCV semblent tout de même bénéficier de l'adjonction de la chimiothérapie ; le statut MGMT pourrait donc être pronostique et prédictif dans cette population [35]. En revoyant les histologies selon la classification WHO 2007, 28 % des patients de l'étude EORTC 26951 présentaient des zones de nécrose et ont donc été reclassés en GBM. Pour ce sous-groupe de patients, aucun lien n'a pu être montré entre le statut MGMT et la survie. Il est difficile, sur ce petit nombre de patients (40), de savoir s'ils se comportent de manière différente de la majorité

Tableau 2. Études ayant analysé le lien entre le statut MGMT et le devenir clinique de patients atteints d'un gliome anaplasique.

Étude	Types histologiques	Fréquence de méthylation	Fréquence de résultats négatifs en IH	Lien avec la clinique	Traitements
Wick <i>et al.</i> (2009)	AA AO AOA	50 % (48/96) 71 % (22/31) 71 % (53/75)		Meilleure survie sans récurrence en cas de méthylation du promoteur, dans les 3 bras.	3 bras : RT/PCV/TMZ.
Van den Bent <i>et al.</i> (2009)	AO et AOA	80 % (121/152)		Meilleure survie sans récurrence et survie globale en cas de méthylation du promoteur dans les 2 bras	2 bras : RT/RT et PCV.
Sadones <i>et al.</i> (2009)	AA et AOA	30 % (6/20)*		Meilleure survie globale en cas de méthylation du promoteur	TMZ lors de la rechute.
Pollack <i>et al.</i> (2006)	AA (enfants)		88 % (45/51) seuil à 25 %	Pas de lien avec la survie dans le groupe des échantillons revus de manière centralisée.	2 bras : CCNU et vincristine/8 drogues dont CCNU et dacarbazine.
Brandes <i>et al.</i> (2006)	AO et AOA AO AOA	69 % (37/54) 70.3 % 29.7 %		Pas de lien avec la survie sans récurrence ou la survie globale.	Traitement à la rechute par TMZ.
Brell <i>et al.</i> (2005)	AA AO et AOA	56 % (18/32) (2/8)	45 % (34/75) 44 % (8/18) Seuil à 5 %	Meilleure survie globale en cas d'absence de la protéine MGMT (pas de lien pour l'analyse moléculaire).	AA : carmustine AOA/AO : PCV.
McLendon <i>et al.</i> (2005)	AO		100 % (21/21) Seuil à 20 %	Pas de lien avec la survie, dans le groupe comprenant les 21AO et 24 O.	Traitements non uniformes.
Kamiryo <i>et al.</i> (2004)	AA	45 % (19/42)		Meilleure survie sans récurrence et survie globale en cas de méthylation du promoteur	ACNU +/- IFN-??

AA : astrocytome anaplasique ; AO : oligodendrogliome anaplasique ; AOA : oligoastrocytome anaplasique ; RT : radiothérapie ; TMZ : témozolomide.
* Technique oncométhylome.

des GBM, pour lesquels l'intérêt prédictif du statut MGMT pour la réponse aux traitements est maintenant reconnu. Notons cependant qu'une étude a montré que l'impact pronostique, pour des GBM traités par

nitrosourées, était surtout important quand la chimiothérapie était administrée de manière concomitante à la radiothérapie, ce qui n'était pas le cas pour l'essai EORTC 26951 [36].

Ces résultats montrent clairement que la détermination du promoteur de la MGMT n'est pas seulement le reflet d'une absence de l'enzyme de réparation expliquant la bonne réponse des tumeurs aux agents alkylants, du moins dans les gliomes anaplasiques. Il serait intéressant de mieux comprendre les phénomènes sous-jacents. Il reste également à définir la place que pourrait prendre la détermination du statut MGMT dans la prise en charge des gliomes anaplasiques, à côté des autres facteurs biologiques connus (1p19q/IDH1), ou pour le moment inconnus.

Dans les glioblastomes

Avant que le traitement standard des GBM ne devienne l'association de la radiothérapie au TMZ, suivi de l'administration en adjuvant du TMZ, différentes études avaient recherché un lien entre le statut MGMT des patients et leur survie. Celles-ci avaient été menées sur des cohortes parfois restreintes de patients, traités de manière non homogène par des agents alkylants et les conclusions restaient incertaines. Lors de l'étude princeps EORTC-NCIC ayant mis en évidence la supériorité du traitement combiné RT + TMZ par rapport à la RT seule [37], l'étude de la méthylation de MGMT avait été faite sur un sous-groupe de patients et avait clairement démontré que les patients présentant une méthylation répondaient mieux au traitement [38]. Ces résultats ont été confirmés, avec un recul de plus de 5 ans. La médiane de survie globale des patients méthylés est de 23,4 mois, avec 13,8 % de survivants à cinq ans contre 12,6 mois et 8,3 % de survie pour les non méthylés [39]. Cela a amené à proposer des nomogrammes, incluant le statut MGMT, le performance status et le score MMSE (*mini-mental status examination*) afin de prédire la survie individuelle des patients [40]. Depuis d'autres études ont confirmé ce résultat et la méthylation du promoteur MGMT peut être considérée comme un facteur prédictif important de réponse au traitement standard des GBM nouvellement diagnostiqués [8, 11, 23, 41–44] (tableau 3). L'intérêt persiste lorsque différentes drogues sont ajoutées au protocole standard [45, 46].

Sur les connaissances actuelles, serait-il licite de ne proposer le traitement à base de TMZ qu'aux patients méthylés ? Afin de répondre à cette question, il faut comparer les courbes de survie des patients non méthylés, ayant eu de la RT seule ou un traitement combiné.

Dans l'essai EORTC-NCIC, il existe une petite différence de survie globale (11,8 mois contre 12,6 mois) et zéro survivant contre quatre au-delà de 4 ans dans le groupe ayant eu le traitement combiné. Les différences sont donc minimales et il n'est pas non plus exclu que quelques patients aient été mal classés par la technique MS-PCR (faux négatifs). Une autre étude rétrospective portant sur des patients ayant eu uniquement de la radiothérapie ou un traitement combiné ne retrouve d'ailleurs pas de longs survivants [41]. Étant donné qu'il semble difficile à l'heure actuelle de proposer un essai sans TMZ, après stratification sur le statut MGMT, ce qui permettrait de répondre de manière formelle à cette question, il faut au moins s'interroger sur l'aspect économique de l'apport éventuel de l'analyse du statut MGMT s'il permettait une sélection des patients. C'est à cette réponse que doit répondre une étude médico-économique multicentrique actuellement en cours en France. Cette étude vise également à comparer différentes techniques d'analyse de la MGMT (le pyroséquençage, la technique MS-HRM, la technique MethyLight et l'IHC), quant à leurs valeurs prédictives, mais également quant à leurs valeurs analytiques. Bien évidemment la valeur prédictive du statut MGMT trouvera surtout sa place lorsque des traitements efficaces alternatifs au traitement standard auront vu le jour.

Le traitement adjuvant standard consiste, après radiochimiothérapie avec TMZ, à administrer le TMZ 5 jours consécutifs, tous les 28 jours. En administrant le TMZ de manière plus prolongée (1 semaine sur 2 ou 21 jours sur 28), on peut avoir une imprégnation plus continue de l'organisme et donc espérer saturer les capacités de réparation de la MGMT. Ce type de schéma d'administration devrait donc théoriquement bénéficier particulièrement aux patients n'ayant pas de méthylation du promoteur MGMT. Dans 3 essais, un schéma 1 semaine sur deux a été proposé à des GBMs en début de traitement. Chinot *et al.*, chez des patients non opérables, trouvent que les patients exprimant peu la protéine MGMT répondent mieux au traitement [47]. Un résultat identique est rapporté par une autre étude, l'intensification de dose semblant bénéficier surtout aux patients avec une méthylation de MGMT [48]. Le troisième essai note une meilleure survie des patients traités par le régime intensif, par rapport aux résultats de l'essai EORTC-NCIC ; celui-ci pouvant notamment bénéficier aux patients non méthylés. Il faut cependant noter que seuls 19 % des patients sont trouvés méthylés dans cette série, ce qui laisse supposer un certain

Tableau 3. Études ayant analysé le lien entre le statut MGMT et le devenir clinique de patients atteints d'un glioblastome.

Étude	Fréquence de méthylation MGMT-PCR classique	Fréquence de méthylation -Autres techniques-	Fréquence de résultats négatifs en IH	Lien avec survie sans récidive	Lien avec survie globale	Remarques
GBM nouvellement diagnostiqués et recevant le traitement standard : radiothérapie et TMZ concomitant suivi de TMZ en adjuvant						
Weller <i>et al.</i> (2009)	45 % (133/295)			Oui	Oui	Lien pour le groupe des 185 patients recevant du TMZ.
Felsberg <i>et al.</i> (2009)	39 % (26/66)		69 % (40/58) Seuil à 10 %	Oui	Oui	Uniquement pour la méthylation du promoteur.
Karayan-Tapon <i>et al.</i> (2009)	68 % (55/81)	50 % pyroséquenceage Seuil à 8 % (médiane)	50 % (39/78) Seuil à 15 % (médiane)	Oui	Oui	Uniquement pour la méthylation du promoteur.
Brandes <i>et al.</i> (2009)	43 % (16/37)			Oui	Oui	Patients âgés de plus de 65 ans.
Dunn <i>et al.</i> (2009)		53 % (58/109) pyroséquenceage Seuil à 9 %		Oui	Oui	
Brandes <i>et al.</i> (2008)	35 % (36/103)				Oui	
Hegi <i>et al.</i> (2005)	44 % (92/206)			Oui	Oui	Lien pour le groupe des 106 patients recevant du TMZ.
Hegi <i>et al.</i> (2004)	68 % (26/38)			Oui	Oui	
GBM nouvellement diagnostiqués et recevant un traitement non standard						
Glas <i>et al.</i> (2009)	48 % (11/23)			Oui	Oui	Ajout de lomustine au TMZ.
Prados <i>et al.</i> (2009)	36 % (16/44)				Oui	Erlotinib ajouté au traitement standard.

Tableau 3. (Suite)

Étude	Fréquence de méthylation MS-PCR classique	Fréquence de méthylation -Autres techniques-	Fréquence de résultats négatifs en IH	Lien avec survie sans récidive	Lien avec survie globale	Remarques
Clarke <i>et al.</i> (2009)	19 % 9/48 (technique non précisée)				Oui (analyse univariée) Non (analyse multivariée)	TMZ en adjuvant, soit en intensification de dose, soit en métronomique.
Weiler <i>et al.</i> (2009)	41 % (16/39)			Oui	Non	TMZ avant RT, puis en adjuvant (1 semaine sur 2), avec indométhacine.
Chinot <i>et al.</i> (2007)			44 % (11/25) Seuil à 35 %	Oui	Oui	TMZ avant RT, puis en adjuvant (1 semaine sur 2), chez des patients inopérables.
GBM en rechute						
Metellus <i>et al.</i> (2009)	29 % (6/21) 31 % (6/19)*	29 % (6/21) 32 % (5/20)* (technique MethylLight)	36 % (8/22) 25 % (5/20)* Seuil à 10 %	Oui	Oui	Implantation de géladiel à la rechute. Pour méthylation Methyl, lien pour la tumeur à la rechute ou la tumeur initiale.
Wick <i>et al.</i> (2007)	47 % (17/36)			Non		TMZ à la rechute (1 semaine sur 2).
Brandes <i>et al.</i> (2006)	45 % (10/22)			Non	Non	TMZ à la rechute (1 semaine sur 2) chez des patients n'ayant pas eu initialement de CT.

TMZ : témozolomide.
* : tumeur à la rechute.

nombre de faux négatifs [49]. Au vu de ces résultats, il n'est donc pas évident que l'intensification du dosage apporte un bénéfice pour les patients non méthylés. Les résultats de l'étude de phase III RTOG-EORTC-0525 permettront peut-être de clarifier ces questions. Cet essai de phase III randomisé a comparé le traitement standard à une intensification de dose. Parmi les objectifs secondaires figure l'étude du bénéfice du traitement intensif chez les patients méthylés et non méthylés.

La détermination du statut MGMT sur la tumeur initiale peut-elle apporter des informations pronostiques pour le traitement à la récurrence ? Dans un essai sur une vingtaine de patients recevant à la récurrence des implants de CCNU (Gliadel®), le statut MGMT initial est corrélé à la réponse [50]. D'autres études utilisant le TMZ (protocole standard ou intensifié) chez des patients ayant déjà eu ou non, de la chimiothérapie, ne trouvent en revanche pas de lien entre le statut MGMT initial de la tumeur et la réponse au traitement [29, 51, 52]. La première question à se poser concerne évidemment l'évolution du profil moléculaire de la tumeur lors de l'évolution de la maladie. Les quelques études ayant analysé la méthylation du promoteur MGMT sur la tumeur initiale et la tumeur à la rechute ne trouvent pas de changement significatif [22, 50, 53]. L'absence de lien pourrait provenir du traitement (chimiothérapie non associée à la radiothérapie lors de la récurrence), ou de l'apparition d'anomalies moléculaires autres que celles touchant la MGMT et associées à un phénotype de résistance.

Conclusion

L'étude du statut MGMT est à l'heure actuelle incontournable lors de la mise en place de nouveaux essais thérapeutiques dans les gliomes, étant donné son intérêt prédictif et/ou pronostique. La justification de son utilisation en routine reste plus délicate, la plupart des cliniciens n'étant pas prêts à abandonner le traitement standard dans les GBM sur des résultats biologiques. Certaines équipes s'appuient cependant sur le statut MGMT dans certains cas particuliers où le bénéfice du traitement standard n'est pas clairement démontré, par exemple pour les patients atteints d'un GBM, traités sans exérèse (biopsie) et âgés de plus de 70 ans. Il apparaît d'autre part que l'intérêt de ce facteur n'est pas restreint à la relation qui existe entre la présence de l'enzyme et la résistance aux agents alkylants.

La mise en évidence de la méthylation du promoteur MGMT pourrait être le reflet d'un phénotype moléculaire ayant une signification pronostique propre. Les études de l'ensemble du méthylome qui commencent à voir le jour devraient nous en apprendre plus à ce sujet. ▼

Conflits d'intérêts : non renseigné par les auteurs.

Références

1. Allan JM, Travis LB. Mechanisms of therapy-related carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 943-55.
2. Yip S, Miao J, Cahill DP, et al. MSH6 mutations arise in glioblastomas during temozolomide therapy and mediate temozolomide resistance. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 4622-9.
3. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 2008; 455: 1061-8.
4. Silber JR, Blank A, Bobola MS, Ghatan S, Kolstoe DD, Berger MS. O6-methylguanine-DNA methyltransferase-deficient phenotype in human gliomas: frequency and time to tumor progression after alkylating agent-based chemotherapy. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 807-14.
5. Wiewrodt D, Nagel G, Dreimüller N, Hundsberger T, Perneczky A, Kaina B. MGMT in primary and recurrent human glioblastomas after radiation and chemotherapy and comparison with p53 status and clinical outcome. *Int J Cancer* 2008; 122: 1391-9.
6. Sasai K, Nodagashira M, Nishihara H, et al. Careful exclusion of non-neoplastic brain components is required for an appropriate evaluation of O6-methylguanine-DNA methyltransferase status in glioma: relationship between immunohistochemistry and methylation analysis. *Am J Surg Pathol* 2008; 32: 1220-7.
7. Nakasu S, Fukami T, Baba K, Matsuda M. Immunohistochemical study for O6-methylguanine-DNA methyltransferase in the non-neoplastic and neoplastic components of gliomas. *J Neurooncol* 2004; 70: 333-40.
8. Felsberg J, Rapp M, Loeser S, et al. Prognostic significance of molecular markers and extent of resection in primary glioblastoma patients. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 6683-93.
9. Mellai M, Caldera V, Annovazzi L, et al. MGMT promoter hypermethylation in a series of 104 glioblastomas. *Cancer Genomics Proteomics* 2009; 6: 219-27.
10. Preusser M, Janzer RC, Felsberg J, et al. Anti-O6-Methylguanine-Methyltransferase (MGMT) Immunohistochemistry in Glioblastoma Multiforme: observer Variability and Lack of Association with Patient Survival Impede Its Use as Clinical Biomarker. *Brain Pathol* 2008.
11. Karayan-Tapon L, Quillien V, et al. Prognostic value of O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase status in glioblastoma patients, assessed by five different methods. *J Neurooncol* 2009.
12. Everhard S, Tost J, El Abdalaoui H, et al. Identification of regions correlating MGMT promoter methylation and gene expression in glioblastomas. *Neuro Oncol* 2009; 11: 348-56.
13. Mikeska T, Bock C, El-Maarri O, et al. Optimization of quantitative MGMT promoter methylation analysis using pyrosequencing and combined bisulfite restriction analysis. *J Mol Diagn* 2007; 9: 368-81.
14. Vlassenbroeck I, Califice S, Diserens AC, et al. Validation of real-time methylation-specific PCR to determine O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene promoter methylation in glioma. *J Mol Diagn* 2008; 10: 332-7.

15. Mollemann M, Wolter M, Felsberg J, Collins VP, Reifenberger G. Frequent promoter hypermethylation and low expression of the MGMT gene in oligodendroglial tumors. *Int J Cancer* 2005; 113: 379-85.
16. Alonso ME, Bello MJ, Gonzalez-Gomez P, et al. Aberrant promoter methylation of multiple genes in oligodendrogliomas and ependymomas. *Cancer Genet Cytogenet* 2003; 144: 134-42.
17. van den Bent MJ, Dubbink HJ, Sanson M, et al. MGMT promoter methylation is prognostic but not predictive for outcome to adjuvant PCV chemotherapy in anaplastic oligodendroglial tumors: a report from EORTC Brain Tumor Group Study 26951. *J Clin Oncol* 2009; 27: 5881-6.
18. Brandes AA, Tosoni A, Cavallo G, et al. Correlations between O6-methylguanine DNA methyltransferase promoter methylation status, 1p and 19q deletions, and response to temozolomide in anaplastic and recurrent oligodendroglioma: a prospective GICNO study. *J Clin Oncol* 2006; 24: 4746-53.
19. Wick W, Hartmann C, Engel C, et al. NOA-04 randomized phase III trial of sequential radiochemotherapy of anaplastic glioma with procarbazine, lomustine, and vincristine or temozolomide. *J Clin Oncol* 2009; 27: 5874-80.
20. Grason-Frodil EM, Kreth FW, Ruiter M, et al. Intratumoral homogeneity of MGMT promoter hypermethylation as demonstrated in serial stereotactic specimens from anaplastic astrocytomas and glioblastomas. *Int J Cancer* 2007; 121: 2458-64.
21. Cao VT, Jung TY, Jung S, et al. The correlation and prognostic significance of MGMT promoter methylation and MGMT protein in glioblastomas. *Neurosurgery* 2009; 65: 866-75; discussion 875.
22. Parkinson JF, Wheeler HR, Clarkson A, et al. Variation of O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) promoter methylation in serial samples in glioblastoma. *J Neurooncol* 2008; 87: 71-8.
23. Dunn J, Baborie A, Alam F, et al. Extent of MGMT promoter methylation correlates with outcome in glioblastomas given temozolomide and radiotherapy. *Br J Cancer* 2009; 101: 124-31.
24. Nakasu S, Fukami T, Jito J, Matsuda M. Prognostic significance of loss of O6-methylguanine-DNA methyltransferase expression in supratentorial diffuse low-grade astrocytoma. *Surg Neurol* 2007; 68: 603-8; discussion 608-9.
25. Watanabe T, Katayama Y, Yoshino A, et al. Aberrant hypermethylation of p14ARF and O6-methylguanine-DNA methyltransferase genes in astrocytoma progression. *Brain Pathol* 2007; 17: 5-10.
26. Komine C, Watanabe T, Katayama Y, Yoshino A, Yokoyama T, Fukushima T. Promoter hypermethylation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase is an independent predictor of shortened progression free survival in patients with low-grade diffuse astrocytomas. *Brain Pathol* 2003; 13: 176-84.
27. Everhard S, Kaloshi G, Criniere E, et al. MGMT methylation: a marker of response to temozolomide in low-grade gliomas. *Ann Neurol* 2006; 60: 740-3.
28. Kesari S, Schiff D, Drappatz J, et al. Phase II study of protracted daily temozolomide for low-grade gliomas in adults. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 330-7.
29. Sadones J, Michotte A, Veld P, et al. MGMT promoter hypermethylation correlates with a survival benefit from temozolomide in patients with recurrent anaplastic astrocytoma but not glioblastoma. *Eur J Cancer* 2009; 45: 146-53.
30. Broll M, Tortosa A, Verger E, et al. Prognostic significance of O6-methylguanine-DNA methyltransferase determined by promoter hypermethylation and immunohistochemical expression in anaplastic gliomas. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 5167-74.
31. Kamiryo T, Tada K, Shiraishi S, Shinjima N, Kochi M, Ushio Y. Correlation between promoter hypermethylation of the O6-methylguanine-deoxyribonucleic acid methyltransferase gene and prognosis in patients with high-grade astrocytic tumors treated with surgery, radiotherapy, and 1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea-based chemotherapy. *Neurosurgery* 2004; 54: 349-57; discussion 357.
32. Pollack IF, Hamilton RL, Sobol RW, et al. O6-methylguanine-DNA methyltransferase expression strongly correlates with outcome in childhood malignant gliomas: results from the CCG-945 Cohort. *J Clin Oncol* 2006; 24: 3431-7.
33. McLendon RE, Herndon JE 2nd, West B, et al. Survival analysis of presumptive prognostic markers among oligodendrogliomas. *Cancer* 2005; 104: 1693-9.
34. van den Bent MJ, Dubbink HJ, Marie Y, Brandes AA, Taphoorn MJ, Wesseling P, et al. IDH1 and IDH2 mutations are prognostic but not predictive for outcome in anaplastic oligodendroglial tumors: a report of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor Group. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 1597-604.
35. DeAngelis LM. Anaplastic gliomas. *J Clin Oncol* 2009; 27: 5861-2.
36. Criniere E, Kaloshi G, Laigle-Donadey F, et al. MGMT prognostic impact on glioblastoma is dependent on therapeutic modalities. *J Neurooncol* 2007; 83: 173-9.
37. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; 352: 987-96.
38. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; 352: 997-1003.
39. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol* 2009; 10: 459-66.
40. Gorlia T, van den Bent MJ, Hegi ME, et al. Nomograms for predicting survival of patients with newly diagnosed glioblastoma: prognostic factor analysis of EORTC and NCIC trial 26981-22981/CE.3. *Lancet Oncol* 2008; 9: 29-38.
41. Weller M, Felsberg J, Hartmann C, et al. Molecular predictors of progression-free and overall survival in patients with newly diagnosed glioblastoma: a prospective translational study of the German Glioma Network. *J Clin Oncol* 2009; 27: 5743-50.
42. Brandes AA, Franceschi E, Tosoni A, et al. Temozolomide concomitant and adjuvant to radiotherapy in elderly patients with glioblastoma: correlation with MGMT promoter methylation status. *Cancer* 2009; 115: 3512-8.
43. Brandes AA, Franceschi E, Tosoni A, et al. MGMT promoter methylation status can predict the incidence and outcome of pseudoprogression after concomitant radiochemotherapy in newly diagnosed glioblastoma patients. *J Clin Oncol* 2008; 26: 2192-7.
44. Hegi ME, Diserens AC, Godard S, Dietrich PY, Regli L, Ostermann S, et al. Clinical trial substantiates the predictive value of O6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 1871-4.
45. Prados MD, Chang SM, Butowski N, et al. Phase II study of erlotinib plus temozolomide during and after radiation therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme or gliosarcoma. *J Clin Oncol* 2009; 27: 579-84.
46. Glas M, Happpold C, Rieger J, et al. Long-term survival of patients with glioblastoma treated with radiotherapy and lomustine plus temozolomide. *J Clin Oncol* 2009; 27: 1257-61.
47. Chinot OL, Barrie M, Fuentes S, et al. Correlation between O6-methylguanine-DNA methyltransferase and survival in inoperable newly diagnosed glioblastoma patients treated with neoadjuvant temozolomide. *J Clin Oncol* 2007; 25: 1470-5.
48. Weiler M, Hartmann C, Wiewrodt D, et al. Chemoradiotherapy of Newly Diagnosed Glioblastoma with Intensified Temozolomide. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009.
49. Clarke JL, Iwamoto FM, Sul J, et al. Randomized phase II trial of chemoradiotherapy followed by either dose-dense or metronomic temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *J Clin Oncol* 2009; 27: 3861-7.

50. Metellus P, Coulibaly B, Nanni I, et al. Prognostic impact of O6-methylguanine-DNA methyltransferase silencing in patients with recurrent glioblastoma multiforme who undergo surgery and carmustine wafer implantation: a prospective patient cohort. *Cancer* 2009; 115: 4783-94.
51. Wick A, Felsberg J, Steinbach JP, et al. Efficacy and tolerability of temozolomide in an alternating weekly regimen in patients with recurrent glioma. *J Clin Oncol* 2007; 25: 3357-61.
52. Brandes AA, Tosoni A, Cavallo G, et al. Temozolomide 3 weeks on and 1 week off as first-line therapy for recurrent glioblastoma: phase II study from gruppo italiano cooperativo di neuro-oncologia (GICNO). *Br J Cancer* 2006; 95: 1155-60.
53. Weller M, Stupp R, Reifenberger G, et al. MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine? *Nat Rev Neurol* 2009.

7.5. article N°3

Hindawi Publishing Corporation
Clinical and Developmental Immunology
Volume 2010, Article ID 689171, 18 pages
doi:10.1155/2010/689171

Review Article

Overview of Cellular Immunotherapy for Patients with Glioblastoma

Elodie Vauleon,^{1,2} Tony Avril,¹ Brigitte Collet,¹ Jean Mosser,² and Véronique Quillien^{1,2}

¹Département de Biologie, Centre Eugène Marquis, Rue de la bataille Flandres Dunkerque, CS44229, 35042 Rennes cedex, France

²UMR6061 CNRS, Université de Rennes 1, IFR 140, CS34317, 35043 Rennes cedex, France

Correspondence should be addressed to Elodie Vauleon, e.vauleon@rennes.fnclcc.fr

Received 30 June 2010; Revised 13 August 2010; Accepted 27 August 2010

Academic Editor: David Kaplan

Copyright © 2010 Elodie Vauleon et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

High grade gliomas (HGG) including glioblastomas (GBM) are the most common and devastating primary brain tumours. Despite important progresses in GBM treatment that currently includes surgery combined to radio- and chemotherapy, GBM patients' prognosis remains very poor. Immunotherapy is one of the new promising therapeutic approaches that can specifically target tumour cells. Such an approach could also maintain long term antitumour responses without inducing neurologic defects. Since the past 25 years, adoptive and active immunotherapies using lymphokine-activated killer cells, cytotoxic T cells, tumour-infiltrating lymphocytes, autologous tumour cells, and dendritic cells have been tested in phase I/II clinical trials with HGG patients. This paper inventories these cellular immunotherapeutic strategies and discusses their efficacy, limits, and future perspectives for optimizing the treatment to achieve clinical benefits for GBM patients.

1. Introduction

Glioblastoma is the most common primary brain tumour in humans [1] and has the most severe prognosis [2, 3]. Despite improved surgical management and a multimodal treatment of concomitant radiotherapy and chemotherapy, followed by adjuvant chemotherapy with temozolomide (TMZ) [4], the prognosis remains poor with median survival of less than 15 months. Research has thus actively focused on testing new therapeutic approaches, including immunotherapy.

Until recently, it was generally assumed that immune reactions do not occur in the brain because of the blood-brain barrier (BBB) and the specific features of the brain such as the absence of conventional lymphatic vessels or the low level of circulating T cells. It is now known however that the central nervous system maintains a two-way communication network with the immune system. Infectious or experimental autoimmune encephalomyelitis animal models allow better understanding of how the immune system operates in the brain.

Under physiological conditions, the brain contains several different immune cell populations. Microglial cells, which most likely arise from hematopoietic cells, colonize

the central nervous system during embryonic development and come to account for 5 to 20% of cells in the central nervous system. Macrophages and dendritic cells (DC) which arise from monocytes circulating in the blood stream are found in perivascular zones, the choroid plexuses, and the meninges. Microglial cells constitute the first line of defense for the brain. They migrate toward inflammatory zones and, after activation, possess phagocytic properties and synthesize several types of cytokines and chemokines enabling the recruitment of other immune cells [5]. Adaptive immune reactions are initiated in cervical nodes. The T cells activated in these nodes present a particular phenotype with an overexpression of $\alpha 4/\beta 7$ integrins and therefore exhibit tropism for the brain [6]. At the present time, the way in which antigens are transported from the brain to the cervical nodes remains unclear. It has been shown in animal models of brain tumours that antigen presenting cells (APC) exit in the brain parenchyma by migrating along the external capsule to reach the cervical nodes [7]; the drainage system is nevertheless different in rodents and humans. In humans, it is known that brain antigens reach the cervical nodes [8], although whether they arrive associated with APC or not remains to be elucidated.

Due to the complex cellular organisation of brain capillary vessels composed of endothelial cells with tight junctions and associated pericytic and astrocytic cells [9, 10], the BBB contributes to the selective entry of immune cells from the periphery into the brain parenchyma. In particular, the multistep model of "rolling/activation/adhesion/transmigration" through the endothelial wall has been proposed to control the arrival of activated T cells into the brain [9, 10]. This mechanism is finely regulated by multiple molecular interactions involving adhesion molecules (i.e. $\alpha 4/\beta 7$ integrins) and chemokines such as CXCR3 [9, 10]. However, in GBM patients, the BBB appears to be disorganised with an asymmetric structure of brain capillaries into the tumour, a dysfunction of tight junctions between endothelial cells, and a decrease in BBB-associated pericytes [9, 11, 12]. In this context, rules that control the trafficking of effector T cells into the tumour site might be completely different.

Different models have been proposed to better understand the effector phase of the immune response in the brain. For example, following a nasal infection with a herpes simplex virus, the first observation is the arrival of macrophages and a few neutrophils, then a few NK and T cells, which will become predominant [13]. Lymphocyte migration was followed in a recent study with injections of CD4⁺ lymphocytes directed against myelin proteins in a model of autoimmune encephalitis: after arriving in the subarachnoid spaces (in leptomeningeal vessels), the lymphocytes migrated along the internal wall of the vessels. After diapedesis, they migrated along the external walls and if they encountered APC (macrophages or DC) presenting myelin antigens, they were then reactivated, synthesized numerous cytokines, and penetrated the brain parenchyma [14]. The brain environment plays a key role for the local expansion of CD8⁺ lymphocytes. In a glioma mouse model, after they arrived to the brain, CD8⁺ T cells can proliferate and further differentiate with enhanced IFN γ and granzyme B expression. These conditioned CD8⁺ T cells express $\alpha E\beta 7$ integrins which enhance their retention into the brain [15]. This induced expression of $\alpha E\beta 7$ integrins could be due to the presence of TGF β . In an infection model, a secondary expansion of CD8⁺ T cells into the brain was observed and was due to the presence of DC *in situ* [16].

An adaptive immune response implies antigen recognition. Our team has demonstrated, in a series of 47 GBM, the frequent overexpression of four tumour antigens: IL13R $\alpha 2$, EGFRvIII, gp100, and TRP2 [17], which are known to induce immune reactions. Other antigens associated with GBM have been described including EphA2, survivin, WT1, SOX2, SOX11, MAGE1, AIM2, and SART1 [18]. T cells directed against IL13R $\alpha 2$ and EphA2 have been demonstrated in the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of a long surviving patient with anaplastic astrocytoma, showing that a spontaneous immune reaction can occur in HGG [19]. While T-cell infiltration is not observed in the normal brain, it can be observed in glioma. Mittelbronn et al. used an immunohistochemistry technique to demonstrate CD8 expression in a few cells (less than 0.1% of the total cell mass) in a series of GBM [20]. In four GBM, Barcia et al. found that CD8⁺ T cells are preferentially located in the brain

parenchyma and in proximity to vessels while CD4⁺ T cells (less numerous than CD8⁺ cells in 3 of the 4 cases) are not found in the parenchyma. In addition, these lymphocytes can express granzyme and form synapses with tumour cells. A few granzyme-expressing NK cells were also found [21]. In the latest contribution, another team used flow cytometry to demonstrate that 0.1 to 3.2% of cells found in tumour tissues express CD3. Half of these cells also express CD56 and are for the majority CD4⁺. However, these unusual CD4⁺ CD56⁺ cells, preferentially found in GBM, do not express CD1d or V $\alpha 24$ TCR chains that are typical markers for NKT cells [22]. Overall, these results suggest that immune reactions are occurring in primary brain tumours, but are largely ineffective as shown by the inevitable recurrence of the disease.

There could be two ways of using immunotherapy for brain tumours. The first is the "active immunotherapy" designed to boost the patient's native immune response. The second is the "passive immunotherapy" where *in vitro* activated immune cells or specific molecules (e.g. antibodies) directly targeting tumour cells are injected. This paper is focused on immunotherapy trials based on cell therapy, exclusively published until may 2010 and inventoried in MEDLINE accessed by the NCBI Pubmed database. All trials with GBM patients (included trials with GBM and other HGG) were selected.

2. Adoptive Immunotherapy

In adoptive immunotherapy, immune cells activated *ex vivo* are administrated to the tumour-bearing patient. The activated cells are either injected directly into the tumour cavity or intravenously. The first types of cells used for gliomas were lymphocyte-activated killer (LAK) cells [23–34]. LAK cells are generally obtained by cultivating peripheral lymphocytes in the presence of IL2 (\pm lectins) yielding populations with different sets of T cells and NK cells with cytolytic properties not specifically directed against tumour cells. Cytotoxic T lymphocytes (CTL) can also be used. CTL can be generated by *ex vivo* antigenic stimulation of PBMC. For gliomas, autologous tumour cells (ATC) are generally used as antigen source [35–37]. Allogeneic CTL stimulated by the patient's own lymphocytes have also been tested [38]. After amplification in the presence of IL2, CTL can be obtained from tumour infiltrating lymphocytes (TIL), as was done in one study [39]. Another approach was to collect lymphocytes from lymph nodes or PBMC after peripheral injection of irradiated ATC and GM-CSF, stimulating them *in vitro* then reinjecting them [40–44].

2.1. Adoptive Immunotherapy Using LAK. Twelve trials treating HGG with LAK have been reported in the literature (Table 1). One pilot study [28], six phase I trials [23–26, 29, 31], and five phase I/II trials [27, 30, 32–34], including 211 patients. In all of these studies except one, the patients were included when their disease relapsed. LAK were administered intracerebrally and delivered into the operative cavity or directly into the lesion. Intrathecal administration was used

in one patient. Number of injected cells ranged from 1×10^6 to 1×10^{10} LAK, generally associated with IL2 doses to the order of 10^9 units per injection. One to fifteen injections were given per patient.

Neurological toxicity was observed in six of the nine trials reporting this factor. The patients presented brain edema or symptoms of aseptic meningitis. Hypereosinophilia was detected in the cerebrospinal fluid or in the peripheral blood in two patients [37] and infiltrations of mononuclears and eosinophils were found in nine of the eleven reoperations and in all three autopsies a regional eosinophilia being associated with increased survival [30, 32].

To assess the efficacy of the treatment, most of the published trials reported in this paper used radiological response criteria: partial response (PR) defined as more than 50% radiographic reduction in tumour volume; minor response (MR) defined as 50 to 25% reduction; and stable disease (SD) defined as less than 25% reduction or less than 20% progression of tumour volume; finally, progressive disease (PD) defined as more than 20% progression in tumour volume or a new lesion. Radiological response reached MR at least once in nine of the twelve trials reporting the radiological response. Combining all reports in the literature, there were 5 CR (complete response) (3 GBM), 13 PR (8 GBM), and 6 SD (6 GBM) in a total of 118 patients. Correlation between the clinical results and radiological response has not been significant [27].

In some trials, median survival for vaccinated GBM patients was higher than the one observed for control groups [30, 32, 33]. For the only trial on newly diagnosed GBM, median overall survival (OS) was 20.5 months, with 75% of patients alive at one year. In this study, a positive correlation was demonstrated between the number of LAK injected and survival as well as a negative correlation between corticosteroid therapy and survival [34].

2.2. Adoptive Immunotherapy Using Other Cell Types. Five trials testing adoptive immunotherapy for HGG have used CTL obtained from PBMC or TIL in 30 patients (Table 2). These were four phase I trials using CTL [35–38] and one pilot study using TIL [39]. In all five trials, the immune cells were injected intracerebrally. Three other phase I trials [40–42] and two pilot studies [43, 44] used CTLs obtained from lymph nodes or PBMCs after intradermal vaccination in a combination strategy using both active and adoptive immunotherapy in 65 patients. The immune cells were injected intravenously, or associated with intracarotid infusion.

In the ten published studies, the number of injections ranged from 1 to 13. The number of cells injected varied from 3×10^7 to 10×10^{10} . IL-2 injections were associated in four trials. Delayed type hypersensitivity (DTH) was observed in reaction to the tumour cells at the point of injection in three of the five trials associating vaccination with adoptive therapy.

Tolerance was satisfactory in all the published trials with no reported grade III/IV events, even with intravenous injections.

Clinically, the ten published trials have reported at least a few cases of SD ($n = 18$) as well as 28 PR and 3 CR among 95 patients treated. Four studies have even been able to demonstrate a benefit in survival. One study failed to find any PR but reported disease-free survival ≥ 8 months in 7 of 15 patients treated, including one patient with > 40 months survival [40]. In one trial, there was a correlation between clinical response and the predominant CD8+ phenotype of T cells present into the vaccines [43]. A correlation between clinical response and immune response revealed by DTH response to autologous tumours was also observed [43, 44].

In the pilot study using autologous TIL, the cytotoxic activity of the vaccines tested *in vitro* against autologous tumours varies depending to the patients and was not correlated to the clinical outcome [39]. However, it is interesting to note that the only patient with CR contained a distinct population of CD8+CD56+ cells (around 20%). As TIL obtained from other patients with PR, TIL exhibited cytotoxic activity against K562 cells, a typical target for NK cells. In contrast, TIL from the patient that failed to respond to the treatment showed no activity against these cells. One could speculate that the presence of cells with NK activity could help the TIL anti-tumour responses [39].

Adoptive immunotherapy leads to clinical responses in some HGG patients: Objective responses have been observed with the minimal number of 3×10^8 LAK cells and 10^7 CTL injected intracerebrally. The absence of clear correlation between the number of effector cells, their cytotoxic activity against autologous tumours, and the clinical outcome might be due to the large variability observed between patients and the limited number of patients enrolled in these trials. This renders difficult, if not impossible, to define an optimal scheme of treatment based on published clinical trials using adoptive immunotherapy. Injection of CTLs or TIL appeared however to allow higher objective responses compared to LAK. Using a mathematical model, Kronik et al. have predicted that GBM would be eradicated by intensive doses from 3×10^8 to 2×10^9 alloreactive CTL injected every 4 to 5 days, dependent of the size of the tumour burden [45]. The impact of chemotherapy or corticosteroids on the treatments' efficacy is also controversial. Whereas these drugs were completely avoided in some trials because of their immunosuppressive effects [23, 31, 33, 34], others studies have shown no influence of steroids or chemotherapy on the generation and the lytic activity of the effector cells [24, 26, 27]. Remarkably, the eosinophil infiltration at the tumour site and in CSF is described in several clinical trials using LAK and CTL [30, 32, 38, 39]. This might be linked to the use of IL2 or GM-CSF, known to induce systemic hypereosinophilia. However, the involvement of these cells in the anti-tumour response should be addressed.

3. Active Immunotherapy

Several antigen sources can be used for active immunotherapy such as intact tumour cells, tumour protein lysates, tumour-derived mRNA, peptides eluted from tumour MHC class I molecules, and synthetic peptides. Antigens can be

TABLE 1: Adoptive immunotherapy in high-grade gliomas using lymphokine activated killer (LAK) cells*.

References	Type of trial	Patients	Administration	Clinical responses
[23]	Phase I	<i>N</i> = 6 progressive HGG	IC (1 injection)	No PR or SD
[24]	Phase I	<i>N</i> = 13 recurrent GBM	IC (2 injections)	1 SD No survival benefit
[25]	Phase I	<i>N</i> = 9 recurrent HGG 7 GBM and 2 AA	IC (15 injections)	1 PR (AA) No survival benefit
[26]	Phase I	<i>N</i> = 20 recurrent HGG 11 evaluated: 9 GBM/2 AA	IC (1 to 2 injections)	Median survival after IT: 18 weeks (>90 weeks— <i>N</i> = 2) Median OS: 63 weeks <i>Correlation between survival and the number of LAK injected</i>
[27]	Phase I/II	<i>N</i> = 19 recurrent gliomas 14 GBM/5 GIII	IC (2nd injection if survival >4 months)	2 PR (GIII) 2 PR, one after 2nd injection (GBM) Median survival after IT: 30 weeks <i>No correlation between clinical and radiographic responses</i>
[28]	Pilot study	<i>N</i> = 5 recurrent GBM	IC (1 injection)	No PR or SD No survival benefit
[29]	Phase I	<i>N</i> = 9 recurrent GBM	IC	1 CR, 2 PR, 4 SD Median OS: 18 months
[30]	Phase I/II	<i>N</i> = 19 recurrent HGG 15 GBM, 4 AA	IC (2 injections) 2nd cycle if no PD	1 CR (AA), 1 delayed CR, 2 PR, 1SD (GBM) Median survival after IT: 53 versus 25.5 weeks (GBM)
[31]	Phase I	<i>N</i> = 10 recurrent malignant tumours 4 GBM, 2 AIII-IV, 2 AII-III, 1 AOA, 1 MDB	IC (<i>N</i> = 9) Intrathecal (<i>N</i> = 1 MDB)(4 to 5 injections)	2 PR (AII-III) Median survival after IT: 13 weeks Median OS: 78 weeks
[32]	Phase I/II	<i>N</i> = 28 recurrent HGG	IC (2 injections) 2nd cycle if no PD	1 CR (AA) 1 CR, 2 PR (GBM) Median OS: 53 versus 26 weeks (GBM)
[33]	Phase I/II	<i>N</i> = 40 recurrent GBM	IC (1 injection)	Median survival after IT: 9 months (excluded secondary GBM) Median OS 17.5 versus 13.6 months (excluded secondary GBM)
[34]	Phase I/II	<i>N</i> = 33 newly diagnosed GBM post RT+CT	IC (1 injection)	Median OS: 20.5 months <i>Correlation between survival and the number of LAK injected; Correlation between survival and absence of corticoids before treatment</i>

*: Abbreviations used in this table: AII/III: grade II and III astrocytoma; AIII/IV: grade III and IV astrocytoma; AA: anaplastic astrocytoma; AO: anaplastic oligodendroglioma; AOA: anaplastic oligoastrocytoma; CR: complete response; CT: chemotherapy; GII/III: grade II and III glioma; GIII/IV: grade III and IV glioma; GBM: glioblastoma; HGG: high-grade glioma; IC: intracranial injection; IT: immunotherapy; MDB: medulloblastoma; OS: overall survival; PR: partial response; RT: radiotherapy; SD: stable disease.

TABLE 2: Adoptive immunotherapy in high-grade gliomas using cytotoxic T lymphocytes (CTL) or tumour-infiltrated lymphocytes (TIL)*.

References	Type of trial	Patients	Administration	Immune response	Clinical responses
CTL obtained from PBMC					
[35]	Phase I	N = 5 HGG 2 newly diagnosed GBM, 2 recurrent GBM, 1 AOA	IC (7 to 13 injections)		2 PR (1 GBM, 1 AOA) No survival benefit (survival >2 years— N = 1 AOA)
[36]	Phase I	N = 4 HGG 3 GBM, 1 AA	IC (3 injections)		3 PR (1 AA), 1 SD
[37]	Phase I	N = 10 recurrent HGG 7 GBM, 2 AA, 1 AOA	IC (3 injections)		1 CR (AA), 4 PR (3 GBM, 1 AA), 3 SD (GBM) Median survival: > 5 months
[38]	Phase I	N = 5 recurrent HGG 2 GBM, 1 AA, 2 AO	IC (3 to 11 injections)	Cerebrospinal fluid hypereosinophilia	3 SD (1 AA, 2 AO) No survival benefit
CTL obtained by lymphocytes from draining lymph nodes or PBMC after vaccination with irradiated ATC					
[40]	Phase I	N = 15 recurrent HGG 12 GBM, 3 AA	IV (1 to 3 injections)	DTH (15/15)	No PR or SD Free disease survival: ≥ 8 months (N = 7) (>40 months N = 1)
[41]	Phase I	N = 10 recurrent HGG 9 GBM, 1 AA	IV (1 injection)		3 PR (1 AA, 2 GBM) Survival after reoperation: > 1 year (N = 4/8)
[42]	Pilot study	N = 9 recurrent HGG 6 GBM, 3 GIII	IV +/- intracarotid infusion (1 injection)	DTH (9/9)	3 PR (1 GBM, 2 GIII with survival > 4 years) <i>Correlation between clinical response and CD4/CD8 composition of infused cells.</i>
[43]	Phase I	N = 12 newly diagnosed glioma: 6 GBM, 2 GII, 4 GIII	IV (1 to 2 injections)		4 PR (2 GBM, 2 GIII) 2 SD (2 GII)
[44]	Pilot study	N = 19 recurrent HGG 16 GBM, 2 AA, 1 gliosarcoma	IV (1 injection)	DTH (17/19)	1 CR, 7 PR, 9 SD Median survival: 12 months <i>Correlation between survival and DTH response</i>
Autologous TIL					
[39]	Pilot study	N = 6 HGG 3 GBM, 3 AA	IC (2 injections)		1 CR (AA), 2 PR (1 AA, 1 GBM)

*: Abbreviations used in this table: see Table 1; DTH: delayed-type hypersensitivity; PBMC: peripheral blood mononuclear cells; IV: intravenous.

used alone and injected in the presence of different adjuvants or presented on DCs which play a key role in initiating the immune reaction.

3.1. Active Immunotherapy Using ATC. Vaccines based on ATC have been used for HGG in eight studies (Table 3) [46–53]: five pilot studies of antitumour vaccination [47, 48, 50–52], one phase I trial [53] and reported in two cases report [46, 49] for a total of 71 treated patients. ATCs are generally inactivated by radiation, sometimes genetically modified [46, 49, 51], and can be infected with a virus [47, 50] to boost the induced immune reaction. In one case, the cells harvested

after surgery were treated with antisense oligonucleotides for insulin growth factor receptor 1 (IGF-IR/AS ODN) before implantation [48]. One pilot study used ATC collected from a fixed tissue, which enabled inclusion of a greater number of patients [52]. Indeed, the establishment of primary lines is a limiting factor; the lack of enough tissue can retard the first vaccination after surgery.

The cells were administered subcutaneously in six series, and intradermally in two others. Injections were associated in two studies with IL2 [47] or GM-CSF infusions [49]. The number of cells injected varied from 10^6 to 10^{11} . The vaccination was repeated in all of these studies, generally for three cycles with a total of 1 to 13 injections.

TABLE 3: Active immunotherapy in high-grade gliomas using autologous tumour cells (ATC)*.

References	Type of trial	Patients	Antigen source Immune activation	Administration	Immune response	Clinical responses
[46]	Case report	N = 1 recurrent GBM	irradiated ATC + fibroblasts genetically modified to secrete IL 2	SC (10 injections)	ATR PBMC (lytic activity)	No survival benefit at 4 months
[47]	Pilot study	N = 11 newly diagnosed GBM after surgery and RT	ATC infected with NDV and inactivated with cisplatin	SC (4 to 5 injections)	DTH (11/11-infected ATC) DTH (3/11-ATC) TI CD4/CD8 T cells (4/4)	No survival benefit <i>No correlation between survival and DTH response</i>
[48]	Pilot study	N = 12 progressive HGG 8 GBM, 4 AA	ATC + IGF-IR/AS ODN	SC (1 to 10 injections)	TI lymphocytes (4/9)	1 CR 2 PR 2 SD (GBM) 1 CR, 2 PR (AA)
[49]	Case report	N = 1 recurrent GBM	irradiated ATC + fibroblasts genetically modified to secrete IL 4	ID (2 injections in 5 sites)	No ATR PBL (ELISPOT)	1 PR-survival: 10 months
[50]	Pilot study	N = 23 GBM after RT	irradiated ATC infected with NDV	ID (5 to 8 injections)	DTH (15/15) ATR PBMC (3/3) (IFN γ ELISPOT) TI CD8 cells (6/7)	1 CR Median OS: 100 versus 49 weeks
[51]	Pilot study	N = 6 3 recurrent GBM 3 melanoma	irradiated ATC transduced with B7-2 and GM-CSF	SC (3 injections)	No ATR PBMC(CTL activity) (GBM)	Longer free disease survival (3/6-1 GBM)
[52]	Pilot study	N = 12 GBM 8 newly diagnosed GBM 4 recurrent GBM	formalin-fixed ATC tuberculin microparticles as adjuvant	SC (3 injections in 5 sites)	DTH (9/12)	1 CR, 1 PR, 2 MR, 1 SD Median survival: 10.7 months 3 of 5 responders survival > 20 months
[53]	Phase I	N = 5 recurrent HGG 4 GBM, 1 AOA	irradiated ATC	SC (4 injections)	DTH (2/5)	3 SD (GBM)

*: Abbreviations used in this table: see Table 1 and Table 2; ATR: anti-tumour responses; ID: intradermal injection; IGF-IR/AS ODN: insulin-like growth factor type I receptor antisense oligodeoxynucleotide; MR: minor response; NDV: Newcastle-Disease-Virus; PBL: peripheral blood lymphocytes; SC: subcutaneous; TI: tumour infiltration.

Tolerance was acceptable in all trials, without any grade III/IV toxic events. There were only a few cases of fever, erythema, and perturbed liver tests. Preventive measures for thromboembolism had to be associated with IGF-IR/AS ODN administration [48].

In most studies reported, at least some patients exhibited immune response induction either in periphery (DTH against the injected tumour cells or anti-tumour responses of PBMC) or most importantly at the tumour site. CD8 T cell infiltration was found for example in one study in six out of seven patients who underwent a reoperation for relapse, but was not found in the four control patients who had a reoperation [50].

The clinical response was evaluated radiologically in five studies demonstrating 4 CR (3 GBM), 6 PR (4 GBM), 2 MR (2 GBM), and 6 SD (6 GBM) in a total of 53 patients.

Three patients with SD in the study of Clavreul et al. appeared to have a longer than usual survival (42, 62, 88 weeks) after a second surgery without other treatment [53]. In this particular study, GM-CSF was infused continuously or discontinuously at the site of the ATC inoculation using a programmable pump. Such a longer survival was also the case for one GBM patient in another study [51]. Steiner et al. [50] found a better PFS in 23 GBM treated patients (40 weeks) in comparison with a control group of 87 patients (26 weeks). These authors demonstrated a benefit in terms of

OS (100 versus 49 weeks), 1-year survival (91% versus 45%), 2-year survival (39% versus 11%), and even 3-year survival (4% versus 0%).

3.2. Active Immunotherapy Using Dendritic Cells. Vaccination with DC has been the most widely studied option: 19 studies (Table 4) [54–72], 11 phase I trials [55, 56, 59–61, 63, 64, 66, 67, 70, 71], 5 phase I/II trials [57, 62, 65, 69, 72], one phase II trial [68], and two case reports [54, 58] including 313 patients. The antigen sources were varied: tumour lysates, peptides eluted from ATC, defined peptides, mRNA derived from ATC, and whole ATC in 10, 4, 1, 1, and 4 studies, respectively. For vaccinations using ATC, the ATC were fused or incubated with DC. Defined peptides were derived from EGFRvIII [70], which appears to be a particularly interesting target as its expression is frequent in GBM [13] and specific of malignant cells.

In most studies, DC were prepared using a standard method, that is, from peripheral monocytes cultivated in the presence of GM-CSF and IL4. In six studies, they were matured using different cocktails with IL1 β , TNF α , PGE2, or IFN γ [57, 61, 63, 71, 72]. In one case, a TLR agonist (OK432) was used [65]. Vaccines were injected intradermally or subcutaneously. In one study, some patients also received intracerebral injections [57]. In one, the vaccination was combined with injections of recombinant IL12 [55]. The number of cells injected ranged from 10⁶ and 10¹⁰. The number of injections and the frequency of the injections were also highly variable.

Tolerance appeared to be acceptable with only one grade IV neurotoxicity (stupor) event being reported for all of these studies [65]. This patient with stupor had a large residual tumour and a perilesional edema probably induced by vaccination. Most of the toxic effects were grade II (headache, seizure, flu-like syndrome). A peripheral immune response (demonstrated by *in vitro* tests or DTH) was observed in more than half of patients. For the twenty-four patients who relapsed after vaccination and had an analysable tumour, lymphocyte infiltrations, particularly CD8 cells, were found in 15 patients.

The radiological response was described in 10 studies with 6 CR (4 GBM), 11 PR (5 GBM), 7 MR (6 GBM), and 27 SD (14 GBM) among the 130 patients. Thirteen studies have reported a beneficial effect in terms of survival compared with historical cohorts or nonrandomized control groups [56, 57, 59, 61, 62, 64, 65, 67–72]. Two studies were unable to find any correlation between induced peripheral immune response and clinical response [64, 72]. From the largest cohort of patients reported (34 GBM), Wheeler et al. showed however that responders presented a global increase of IFN γ synthesis (before versus after vaccination using *in vitro* PBMC stimulation) compared with non-responders. In addition, this study showed that responders to vaccination exhibited a better response to chemotherapy delivered in a second phase [68]. In their study, Liau et al. [64] had four patients with increased intratumoural infiltration by lymphocytes who had been vaccinated at a time when the tumour was minimal. This T-cell infiltration

was correlated with decreased intratumour TGF β and with better survival. The opposite was observed for three other patients without T-cell infiltration (vaccination in presence of a major tumour, OS < 12 months, and strong presence of intratumour TGF β at relapse). One study showed that patients vaccinated with mature DC had better survival than those vaccinated with immature DC and that conjoint administration of DC in the peripheral blood and intracranially gave a superior response than peripheral injection alone [65].

Summarizing, active immunotherapy appears to have a beneficial effect in some patients, particularly those with a small tumour, without major toxicity. Both clinical trials using ATC and DC demonstrate induced immune responses (detected by DTH, tumour infiltration and/or anti-tumour responses of PBMC) and some clinical responses. Once again, due to the large variability of protocols tested in these trials, that is, the source of ATC, the type of DC used, the cell number injected, the number of injection, the type of adjuvants, it is almost impossible to recommend a particular approach. One can just point out that for DC, no dose-related toxicity or efficacy has been demonstrated [64]. In addition, it seems better to favour mature DC compared to immature DC.

4. Discussion

There were 76 objective responses (18 CR and 58 PR) in the 396 HGG patients described in the trials reported in this paper. Forty-nine and 27 responses were reported for adoptive and active immunotherapy, given objective responses rates of 23% and 15% respectively. Only patients with residual disease at the time of the vaccination can be evaluated for CR or PR; patients who undergo a gross total resection can only achieve stable disease as their best radiographic outcome. For other solid tumours, similar criteria based on radiological tumour measurements (RECIST-based criteria) are used. Using these criteria, a 3.3% overall objective response rate was reported for 1306 patients with different metastatic cancer vaccinated with peptides, pox viruses, tumour cells, or dendritic cells [73]. Higher response rate seems therefore to be observed for HGG. However, one must emphasize that some trials reported in this paper do not specify the exact criteria to define a PR and/or the duration of the response. To achieve a CR or PR according to Macdonald criteria, the most widely used criteria for assessing responses to therapy in HGG, the radiological response must be sustained for at least 4 weeks. Furthermore, clinical assessment and corticoid dose must also be taken into account. Few reports are currently evaluated following these criteria, which renders difficult comparisons between trials, but could also lead to an optimistic interpretation of some of them explaining the very high percentage of responses. If clinical response has to be evaluated following an immunotherapy protocol, one should advise to use the Macdonald criteria, in particular the last recommendations issued from the international neuro-oncology working group that take into account some limitations of these criteria [74].

TABLE 4: Active immunotherapy in high grade gliomas using dendritic cells (DCs)*.

References	Type of trial	Patients	Antigen source	DC maturation	Administration	Immune response	Clinical responses
[54]	Case report	N = 1 recurrent GBM	Acid eluted peptides from allogenic GBM	none	ID (3 injections)	TI T cells	No survival benefit
[55]	Phase I	N = 8 progressive HGG 5 GBM, 2 AA, 1 AO after RT and/or CT	Fusion of ATC with DC	none	ID (1 to 7 injections)	Increased CD56 in PBL (4/5) ATR PBMC (6/6) (IFN γ ELISA)	1MR, 4SD (GBM) 2SD (AA, AO)
[56]	Phase I	N = 9 newly diagnosed HGG: 7 GBM, 2 AA after RT	Antigens eluted from ATC	none	ID (3 injections)	ATR PBMC (4/7) (lytic activity) TI CD4, CD8, CD45RO cells (2/4)	Median survival after IT: 455 versus 257 days (GBM)
[57]	Phase I/II	N = 10 HGG 7 GBM after RT, 3 recurrent GIII	ATC lysates+ KLH	none	ID and/or IC (1 to 10 injections)	DTH (3/6) Increased CD56 (5/5); CD8, CD16, CD19 (4/5) in PBL ATR PBMC (2/5) (IFN γ ELISPOT) TI CD4, CD8 cells (2/2)	2 MR, 2SD (GBM), 2SD (GIII) OS > 200 weeks (N = 2 ID + IC; N = 1 ID)
[58]	Case report	N = 1 recurrent GIII	ATC lysates	none	ID (6 injections)	DTH after 2nd vaccination	CR maintained 2 years after IT
[59]	Phase I	N = 14 HGG 1 GBM, 1 AA, 9 recurrent GBM, 3 recurrent AA	ATC lysates	none	SC (3 injections)	Increased IFN γ RNA in PBMC (6/10) ATR T cells (4/9) (HER-2, gp100, MAGE-1 tetramers) TI CD8, CD45RO cells (3/6)	Median survival after IT: 133 versus 30 weeks (8 recurrent GBM)
[60]	Phase I	N = 7 relapsed brain tumours 2 GBM, 1 AA, 4 others Age: < 25 years	ATC RNA	none	ID (3 to 5 injections)	No ATR PBMC (0/3) (IFN γ ELISA)	1 PR (1XA) 4 SD (1AA, 3 others)
[61]	Phase I	N = 12 recurrent HGG 11 GBM, 1 PXA	ATC lysates	IL1 β , TNF α , and PGE2	ID (2 to 7 injections)	DTH after 2 vaccinations (6/8) DTH after 5 vaccinations (7/8)	1 PR, 1 SD, 1 CR (GBM) 1 CR (PXA) Median OS: 10.5 months 36-month OS: 17%
[62]	Phase I/II	N = 25 newly diagnosed GBM after RT Vaccine alone (N = 12) Vaccine and chemotherapy (N = 13)	ATC lysates or peptide elutions	none	ID (3 injections)	Vaccine alone: ATR PBMC (4/11) Vaccine and chemotherapy: ATR PBMC (4/13) (lytic activity and IFN γ Q-PCR)	Vaccine or chemotherapy alone: 2-year survival: 8% Vaccine and chemotherapy: 3 PR - 2-year survival: 42%
[63]	Phase I	N = 15 recurrent HGG 6 GBM, 7 AA, 2 OAA	Fusion of ATC with DC	TNF α	ID (3 injections)	DTH (15/15) ATR PBL (2/8) (lytic activity)	1 SD (GBM), 3 PR, 1 MR (AA) 1 PR, 1SD (AOA)
[64]	Phase I	N = 12 GBM 7 newly diagnosed GBM 5 recurrent GBM	Acid elution from ATC	none	ID (3 injections)	ATR peripheral T cells (6/12) (lytic activity) TI CD8 CD45RO cells (4/8)	1 PR Median OS: 23.4 versus 18.3 months

TABLE 4: Continued.

References	Type of trial	Patients	Antigen source	DC maturation	Administration	Immune response	Clinical responses
[65]	Phase I/II	N = 24 recurrent HGG 18 GBM, 6 GIII after RT+nitrosourea	ATC+ KLH	none or OK432	ID (immature or matured DC) +/- IC (immature DC) (1 to 10 injections)	DTH (8/17) ATR PBMC (7/16) (IFN γ ELISPOT)	1PR, 3MR, 6SD (GBM) 4SD (GIII) Median OS: 480 versus 400 days <i>Longer survival if DC maturation or IC injection</i>
[66]	Phase I	N = 2 HGG 1 recurrent GBM, 1 recurrent AA after total resection	Irradiated ATC	Fibroblast transduced TGF/IL4	ID (2 injections)	ATR PBMC (1/1) (EphA2 ELISPOT)	2 PR
		N = 5 HGG 5 newly diagnosed GBM after total resection+RT	ATC lysates	Mixture of TGF/IL4 transduced fibroblasts with DC (IFN γ , IL1 β and TNF α)	ID (2 injections)	No response	No response
[67]	Phase I	N = 139 GBM (2 recurrent), 4 AA (3 recurrent)	inactivated ATC	none	ID (2 to 13 injections)	TI CD8 CD45RO T cells (3/3)	12-month survival: 46% 18-month survival or more: 23%
[68]	Phase II	N = 34 GBM 23 recurrent 11 newly diagnosed	ATC lysates	none	ID (3 to 4 injections)	ATR PBMC (17/34) (IFN γ PCR)	3 CR, 1 PR Median survival after IT: 642 days versus 430 days
[69]	Phase I/II	N = 56 recurrent GBM	ATC lysates	IL1 β , TNF α and PGE2	ID (3 to 9 injections +/- ATC lysates)	DTH (9/21 at diagnostic, 2/12 after vaccination)	Median OS: 9.6 months
[70]	Phase I	N = 12 newly diagnosed GBM	EGFRvIII antigen + KLH	None	ID (3 injections)	DTH EGFRvIII (5/9) DTH KLH (9/9) ATR PBMC (10/12) (EGFRvIII-induced proliferation)	Median OS: 22.8 months
[71]	Phase I	N = 45 children HGG 23 GBM, 5 AA, 1 OAO, 16 other HGG	ATC lysates + imiquimod	IL1 β and TNF α	ID (2 to 7 injections) +/- ATC lysates boosts		All HGG: Median OS: 13.5 months GBM alone: Median OS: 12.2 months
[72]	Phase I/II	N = 8 newly diagnosed GBM (Stupp protocol)	ATC lysates	IL1 β , TNF α , and PGE2	ID (4 injections+ ATC lysates)	DTH (2/5) Increased CD8/CD25 in PBL (6/7) ATR PBMC (5/8) (IFN γ ELISPOT)	Median OS: 24 months

*: Abbreviations used in this table: see Table 1 to Table 3; KLH: keyhole limpet haemocyanin; PXA: pleomorphic xanthoastrocytoma; XA: xanthoastrocytoma.

The interaction between injected or induced immune cells and tumour cells can lead to an equilibrium rather than a destruction. Objective criteria based on changes in the tumour masses may therefore not be well adapted to assess this type of response. That is why survival is often regarded as a better endpoint after immunotherapy. Several studies reported in this paper have shown better survival for

patients treated with immunotherapy compared to patients from historical cohorts or nonrandomized groups. All are phase I/II trials, with a limited number of patients, which must lead to a cautious interpretation. Lower tumour grade, extent of resection, younger age, good performance status, mutation of IDH1, as well as an intact neurological function are recognised as favourable prognostic factors for HGG

[75]. These factors should therefore be taken into account for the survival analysis. This implies the implementation of trials with higher numbers of patients and/or more selected patients to lead to more conclusive data about the impact of immunotherapy for HGG and GBM patients.

The immune therapy was in these trials well tolerated, with few grade III/IV adverse events. Cerebral oedemas were often detected in active immunotherapy using effector cells directly infused in the tumour site. However this side effect is difficult to separate from oedema usually observed after surgery. Alternatively, IL2 and GM-CSF used as adjuvant, might lead to vascular perturbations leading in edema formation. Therefore, an MRI before this type of treatment is necessary to distinguish the increased cerebral edema due to surgery from immunotherapy. The lack of other major side effects could be explained by the selectivity of the treatment aiming at destroying specifically tumour cells. Alternative explanations could be the relative inefficacy of the treatment or the frequently use of steroids in glioma that could prevent some major side effects. Up to now, major toxicity has not been reported, except for one patient with bulky residual tumour, for whom an overwhelming peritumoural inflammatory reaction was observed, after injection of DCs [61]. Phase III will help to validate the positive impact on survival, without severe adverse event.

Treatment for newly diagnosed GBM begins with surgery when feasible, followed by focal radiotherapy (RT). For patients up to 70 years, the current standard of care comprises also a temozolomide (TMZ) chemotherapy during and after RT. At recurrence, repeat surgery, as well as new lines of chemotherapy like nitrosourea or bevacizumab (+/- irinotecan) may prolong survival in some patients. Despite this multimodal treatment, mean overall survival remains below 16 months [76]. Most studies reported in this paper began while TMZ was not included in the standard care, allowing the choice of immunotherapy immediately after RT in newly diagnosed patients. In some patients, TMZ has marginal activity, if any, and MGMT status is a strong predictive factor of response to TMZ [77]. These patients should therefore benefit from alternative strategies, like immunotherapy. Before this, the best technique for MGMT analysis has to be assessed [78]. Another solution is to add immunotherapy to the standard treatment, as recently reported for 8 patients for whom DC injections were performed between the end of the radio/chemotherapy and the beginning of the adjuvant chemotherapy [72]. This is based on the hypothesis that combination of treatments could increase the tumour-specific response, as it has been observed in animal models. RT could kill tumour cell by apoptosis, favouring cross-presentation by APC, and it has been shown that it upregulates the expression of MHC molecules by tumour cells favouring their killing by CTL [79–81]. TMZ could decrease the number of regulatory T cells; also this effect was only observed with a low-dose metronomic regimen in a SC-implanted rat glioma model [82]. CCL2 is produced by glioma tumour cells and has both direct and indirect inhibitory effects, among which attraction of T reg cells. As TMZ can reduce CCL2 secretion by glioma tumour cells, this could augment indirectly the efficacy of

immunotherapy [83, 84]. Currently, most of the proposed immunotherapy trials for HGG required that patients are operated on, either to perform direct intracranial injection, or to get tumour as source of tumour antigens. This induces a limitation in the number of patients who can be enrolled in this type of trial, particularly at the time of recurrence (less than 10% have a second surgery in the study of Bauchet et al. on 952 GBM patients [76]). Another potential limitation comes from the corticosteroids given to patients to reduce tumour-associated oedema. Dexamethasone, frequently taken by patients before and sometimes after surgery induces a deep decrease in peripheral lymphocytes, as well as an increase of abnormal circulating monocytes characterised by the phenotype CD14+/HLA-DR low/neg [85]. This could prevent the obtaining of large number of effector cells in some adoptive approaches and therefore decrease the treatment efficacy, although the impact of corticosteroids is not clear for the reported studies. Furthermore CD14+/HLA-DR low/neg monocytes are unable to fully differentiate into mature DC, which can be a problem for vaccination with DC. That is why some trials are restricted to patients off steroids at the time of leukapheresis and during vaccination.

Up to now, the best results for patients with metastatic melanoma have been obtained with adoptive therapy involving lymphodepletion followed by the intravenous injection of *ex vivo* expanded TIL plus IL2. The addition of the lymphodepletion preparative regimen consisting in a chemotherapy (cyclophosphamide and fludarabine) and whole body irradiation resulted in objective response rates of 52% and 72% in two trials with both 25 patients, with increased survival compared to patients who received T cells without lymphodepletion. One of the key improvements is the persistence of infused cells, which is highly associated with objective response. Lymphodepletion could act by eliminating competition for homeostatic cytokines, in particular IL15, for which high levels can be detected only after treatment. Other factors, like elimination of T reg cells could also play major roles [86]. In case of residual tumour after surgery, adoptive cell therapy could therefore be an option for HGG, but it has to be refined in order to increase efficacy. The direct intracerebral delivery by infusion in the tumour site at the time of surgery or by the use of catheter/reservoir systems is often chosen in immunotherapy using LAK and CTL cells. Indeed, this particular route bypasses the finely regulated migration through the BBB and therefore allows to have high number of effector cells at the tumour site. Data comparing with the same cells peripheral and local injection are lacking, but clinical results are also observed after intravenous injection. Standard *in vitro* tests, such as phenotyping of effector cells or killing assays against tumour cells, should help to predict the treatment efficiency on a particular patient. However, the phenotype of the effector cells used in the different clinical trials with adoptive therapies varies between patients and has no clear impact on the clinical outcome that is, the presence of T-LAK (CD3+) and LAK cells (CD3– CD56+) in LAK trials or the ratio of CD4/8 cells in CTL trials. Moreover, most of the studies using LAK and CTL cells could not correlate the high cytotoxicity activity of the effector cells observed *in vitro*

against autologous tumour cells and the *in vivo* efficiency of the treatment. This highlights the need to integrate the recent advances in the field in order to improve the quality of the injected cells. As the killing activity of LAK is not specific, it seems better to use CTL. CTL can be expanded from TIL repeatedly stimulated *in vitro*. This technique works very well for melanoma, a tumour wellknown to induce significant numbers of CTL during the natural course of the disease. Though Quattrocchi et al., in the only trial using this approach, expanded up to 3×10^9 lymphocytes from tumours [35] it could be less adapted for glioma patients. Another common source of CTL is PBMC from the patient. Up to now, published studies have used autologous tumour cells as antigenic stimulations, which can lead to polyclonal expansion of specific CD8 and CD4 cells. Over the last decades, significant progress in active immunotherapy has been achieved in melanoma patients owing to the discovery of well-defined tumour antigens expressed on melanoma cells. As several glioma-associated antigens (GAAs) are now known, it becomes possible to expand CD8+ T cells against these GAA, giving the possibility to treat patient even when tumour cells are not available, but also allowing genetic modifications of the autologous lymphocytes [87]. As persistence of cells *in vivo* is a major point for the success of adoptive immunotherapy, it is interesting to note that persistence of effector cells at the site of the tumour was often transient as observed on biopsies or tumour samples analysed after relapse in the reported studies. In the addition to improve the injected cells, working on this point could therefore lead to great improvements. Instead of proposing heavy treatments inducing lymphodepletion, the use of alternative cytokines to IL2, like IL15 could be tested as well as the combination of an active vaccination. In an animal model, the concomitant adoptive transfer of T cells and a vaccination improves substantially the anti-tumour efficacy of the treatment [88]. It is likely that all these developments will soon benefit to adoptive T-cell therapy against malignant gliomas.

Most studies suggest that cancer vaccine could have the most benefit in state of low tumour burden. This is also observed in a series of 56 recurrent GBM patients vaccinated with DC. Total resection before vaccination was the only predictor of a better survival [69]. In contrast to adoptive immunotherapy, for which administered effector cells can lead to a direct lysis of tumour cells, active immunotherapy requires the initiation and development of an immune reaction. Due to the risk of a rapid regrowth of the tumour before the development of an effective antitumoral reaction in case of residual disease, one may advice treatment with active immunotherapy only after maximal tumour resection.

Vaccination strategy can consist of inoculation of inactivated autologous tumour cells. The first limitation step of the approach is the culture of the tumour cells. It is not always possible to establish primary cell lines from malignant gliomas. In the study of Parney, on 116 malignant gliomas, culture was successful in 61% of cases [51]. In some cases *in vitro* growth is not sufficient to allow vaccination. The delay between the beginning of the culture and the time when vaccine preparation is available can be very long. Median

expansion times range between 4.5 and 30 weeks [47, 50, 51, 53], which explain that some patients may progress before receiving the vaccine. One additional limitation is the possibility that the immunologic phenotype of glioma cells might change after passaging *in vitro* (Anderson, 2002) [89], which could decrease the efficacy of the vaccine. Very often, cells are injected with adjuvants like IL2 or GM-CSF are modified to express costimulatory molecules or cytokines, or are infected with virus in order to increase their immunogenicity. The way all these potential adjuvants act is poorly understood and their real impact is debate. For example, the use of combined GM-CSF is supported by numerous preclinical studies, in gliomas and in other cancers [90–92]. However, two recent randomized trials in melanoma patients showed that GM-CSF could be harmful as immune adjuvant. In the first study, patients received allogeneic tumour cells and BCG, with or without GM-CSF. A diminished DTH response as well as an increase in early deaths was observed in the GM-CSF arms [93]. In the second study, 12 MHC class I-restricted and one HLA-DR-restricted tetanus peptides were injected with or without GM-CSF. CD8+ and CD4+ T-cell response rates to the injected peptides were higher without GM-CSF [94]. Effects could be different according to the route of administration and the doses [45]. A possible mechanism by which GM-CSF could interfere is the induction and activation of myeloid-derived suppressor cells [95]. This highlights well that manipulating the immune system can induce stimulation as well as suppression. All the difficulty of immunotherapy lies in finding the good equilibrium between both.

Most of vaccination protocols for HGG patients have used DC, the most potent APC. This reflects the popularity of this vaccine approach: up to now, more than 3000 patients suffering from varied cancers, enrolled in more than 200 trials have received DC (<http://www.mmri.mater.org.au/>). Many recent reviews have focused on the use of DC as cancer vaccine [96–98], and in particular for malignant gliomas [99–101]. Many options are available about the way to prepare DC, to load them with tumour antigens, to inject them. Some processes used in the protocols for HGG patients require to have autologous tumour cells, to elute peptides, or to fuse them with DC. This implies large cultures of tumour cells and thus the problems already discussed. To overcome this issue, glioma-cell lysate are used in a number of trials. This has the advantage of providing a panel of personalised class I and class II peptides, like with autologous tumour cells. There is however a theoretical risk of autoimmune encephalomyelitis, due to the frequent presence of nontumour glial cells in the tumour. Though up to now such side effects have not been reported, one can fear that in the case of higher efficacy of immunotherapy it may happen. DC can be loaded with synthetic tumour antigens like peptides (short or long), proteins or transfected with encoding antigen nucleic acids. In one published study, DC were pulsed with EGFRvIII peptides [70] and in an ongoing study, DC are loaded with 4 peptides derived from EphA2, IL-13R α 2, YKL-40, and GP100 [18]. The use of defined TAA reduces the risk of autoimmunity (if TAAs are specific to tumour cells), but it implies the previous selection of

patient according to their MHC haplotype if using peptides and sometimes patients are also selected according to the expression of the tumour antigens by the tumour. Currently, a universally expressed glioma TAA does not exist, limiting the usefulness of this approach to patients whose tumour expresses the selected TAA. Furthermore, with the use of a limited number of tumour antigens, there is a theoretically greater risk of an immune escape due to clonal expansion of antigen-loss variants. Among the improvement expected in the loading of DC, the use of antigens expressed by tumour stem cells could be a promising perspective, due to the major role these cells may play in the regrowth of tumour after treatment [102, 103].

About the best way to generate DC *in vitro*, specialists consider that mature DCs (mDC) are superior to immature DCs (imDC) [98]. They can migrate in higher rate to the draining lymph nodes after peripheral injection, they upregulate several costimulatory molecules and can produce different cytokines. Improving the maturation protocol, in order to have the "perfect" DC remains a big challenge in the field. Most published clinical trials in HGG have used imDC or DC matured with pro-inflammatory cytokines. An interesting alternative to mature DC is the use of Toll-like receptor (TLR) ligands, which can mimic bacterial or viral infections, triggering a process of maturation in DC. In the study of Yamanaka et al., patients received either imDCs or DCs matured with OK432, a streptococcal preparation acting notably through the activation of TLR4. Patients vaccinated with mDC had longer survival than those vaccinated with imDC [65]. Van Gool et al. reported an improvement in PFS curves between HGG whose skins were pretreated with imiquimod (which binds TLR7) before the injection of DC matured with TNF α and IL1 β and patients receiving only DC matured with TNF α , IL1 β , and PGE2 [99]. The maturation cocktail designed by Mailliard and colleague (poly I:C, IFN α , TNF α , IL1 β and IFN γ) allows the generation of fully mature DC, with high migratory responsiveness to lymphoid organ chemokines and an ability to produce significant levels of IL12p70 after CD40 ligation (which mimics the interaction between DC and CD40L-activated cells in lymph nodes) [104]. In a model of tumour-bearing mice such so-called α -type-1 polarized DCs, pulsed with peptide antigens can migrate into draining lymph nodes after SC injection and induce antigen-specific CTL, allowing a prolong survival. The secretion of CXCL10 by these DC seems to play a major role in the induction of specific CTL and their homing to the brain [105]. As the efficacy of type-1 α -DC loaded with glioma-associated antigen epitopes, in combination with the administration of poly-ICLC, is currently tested in recurrent malignant gliomas [18], the translation (or not) of these promising results into the clinic will be known soon.

The relevance of intravenous DC injection has never been tested for HGG patients. It is worth noting that the only autologous cellular immunotherapy approved by the US FDA is based on the intravenous administration of PBMC cultured with recombinant PAP-GM-CSF for the treatment of metastatic prostate cancer [106]. In most of the studies reported in this paper, DC were injected in the skin. As priming of T cells within the cervical lymph

is important to induce effector T cells with the ability to home in to the central nervous system, injection of DC in regions allowing them to reach these nodes appears to be a good option. Direct intranodal injection, under echographic guidance is also feasible and allows more DC to reach the nodes. However, following intranodal injection, DC are not always correctly injected into the nodes [107, 108] and as limited numbers of DC in the draining lymph nodes are sufficient to induce a specific immunologic response [109], intradermal injections appear as the best compromise. In their study, Yamanaka et al. showed that patients receiving both intratumoral and intradermal DC injections had longer overall survival than those receiving only intradermal DC [65]. The usefulness of this combination has recently been confirmed in animal models: the addition of intratumour injection to SC injections leading to an increase of CD8+ T cells in the tumour and an increase in survival [105, 110]. Intratumoural DC activity could be due to intratumour secretion of cytokines and chemokines (depending on the type of DC injected) and/or migration of DC to draining lymph nodes. A better understanding of this mechanism should therefore lead to considering this option for future trials.

Whatever the immunotherapy approach, one fundamental element to take into consideration is the corrupted tumour microenvironment which favors tumour development. Different mechanisms developed by glioma cells can suppress anti-tumour immune responses. Several defects at the systemic level have been reported in glioma patients such as decreased T-cell responsiveness [111, 112], increased circulating regulatory T cells [113, 114], and defective monocytes and DC functions [115–117]. Various factors produced by glioma cells might contribute to these defects such as TGF β , PGE2, and IL10 [118–123].

Beside these systemic effects, glioma cells develop several molecular strategies to inhibit directly the immune cell effectors at the tumour site. Several intracellular, membrane and soluble molecules have been described as taking part in this phenomenon such as CD70 [124, 125], FasL [126–128], gangliosides [125], HLA-G [129], PDL-1 [130–132], IDO [132–134], and TGF β 1-3 [135]. We have recently described the involvement of TGF β 2, IDO, and PDL-1 on GBM immunosuppressive properties on T-cell functions in a tumour-specific T-cell model [132]. Different groups have also focused on immunosuppressive cells that are recruited at the site of the tumour. Indeed, tumour immunederivation involved a particular chemokine profile that could specifically induce the recruitment immunosuppressive cells such as T reg and myeloid-derived suppressor cells (MDSC). Glioma-infiltrating microglia/macrophages (GIM) represent the largest population infiltrating human glioma with around a third of the cells present in the tumour mass [114]. GIM are poor T-cell activators due to lower expression levels of molecules such as HLA class II or costimulatory CD80 and CD86 molecules [114]. Furthermore, GIM secrete factors that support the tumour invasion and proliferation [18]. As described systemically, T cells are also present at the tumour site [114, 136, 137], although their presence seems to have no impact in patient prognosis. MDSC are a heterogeneous

population of cells that can suppress T-cell responses [138]. One recent study performed in a rat model has shown an infiltration of such cells following immunization with tumour antigens [139]. These cells could therefore play a major role in gliomas.

A better efficacy could certainly associate optimized standard immunotherapy protocols with treatments designed to hamper this immunomodulation. The early results using immunomodulator molecules have been encouraging (as an example CTLA4 blockade in melanoma patients [140]) and one trial in melanomas recently demonstrated the potential interest of combination of CTLA4 blockade with a DC vaccine [141]. Different strategies are currently under study to decrease the deleterious effect of Treg as injection of low-dose cyclophosphamide (metronomic cyclophosphamide) [142], or injection of CD25 (high) targeting immunotoxin (denileukin diftitox). This latter approach has also been tested in association with DC vaccination [143]. Molecules designed to inhibit the action of TGF β , IDO, and PD1 are also being tested clinically. Preclinical studies in glioma models have shown the interest to combine vaccination with inhibition of TGF β [144] or depletion of Treg [145].

In conclusion, immunotherapy can be considered as a potential new interesting weapon for treatment of patients with HGG and one should expect many improvements of this type of approach over the next years. However, there is a need for well-designed trials with higher numbers and more homogenous patients, taking into account the current recognized prognostic or predictive factors like and leading to phase III randomized studies.

Acknowledgments

This work was supported by the "Ligue Contre le Cancer" Committee of Ile-et-Villaine and Maine-et-Loire, as well as the Institut National du Cancer (the "From the core to the margin" glioma project), Région Bretagne (GIS Thérapie cellulaire, CPER 2008–2013), and the foundation "Aidez la recherche". G. Pope postedited the English style.

References

- [1] P. Kleihues, D. N. Louis, B. W. Scheithauer et al., "The WHO classification of tumors of the nervous system," *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, vol. 61, no. 3, pp. 215–225, 2002.
- [2] J. L. Fisher, J. A. Schwartzbaum, M. Wrensch, and J. L. Wiemels, "Epidemiology of brain tumors," *Neurologic Clinics*, vol. 25, no. 4, pp. 867–890, 2007.
- [3] L. M. DeAngelis, "Brain tumors," *The New England Journal of Medicine*, vol. 344, no. 2, pp. 114–123, 2001.
- [4] R. Stupp, M. E. Hegi, W. P. Mason et al., "Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial," *The Lancet Oncology*, vol. 10, no. 5, pp. 459–466, 2009.
- [5] B. R. Tambuyzer, P. Ponsaerts, and E. J. Nouwen, "Microglia: gatekeepers of central nervous system immunology," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 85, no. 3, pp. 352–370, 2009.
- [6] T. Calzascia, F. Masson, W. Di Berardino-Besson et al., "Homing phenotypes of tumor-specific CD8 T cells are predetermined at the tumor site by crosspresenting APCs," *Immunity*, vol. 22, no. 2, pp. 175–184, 2005.
- [7] J. Karman, C. Ling, M. Sandor, and Z. Fabry, "Dendritic cells in the initiation of immune responses against central nervous system-derived antigens," *Immunology Letters*, vol. 92, no. 1–2, pp. 107–115, 2004.
- [8] M. van Zwam, R. Huizinga, M.-J. Melief et al., "Brain antigens in functionally distinct antigen-presenting cell populations in cervical lymph nodes in MS and EAE," *Journal of Molecular Medicine*, vol. 87, no. 3, pp. 273–286, 2009.
- [9] P. Mrass and W. Weninger, "Immune cell migration as a means to control immune privilege: lessons from the CNS and tumors," *Immunological Reviews*, vol. 213, no. 1, pp. 195–212, 2006.
- [10] E. H. Wilson, W. Weninger, and C. A. Hunter, "Trafficking of immune cells in the central nervous system," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 120, no. 5, pp. 1368–1379, 2010.
- [11] D. C. Davies, "Blood-brain barrier breakdown in septic encephalopathy and brain tumours," *Journal of Anatomy*, vol. 200, no. 6, pp. 639–646, 2002.
- [12] G. Rascher, A. Fischmann, S. Kröger, F. Duffner, E.-H. Grote, and H. Wolburg, "Extracellular matrix and the blood-brain barrier in glioblastoma multiforme: spatial segregation of tenascin and agrin," *Acta Neuropathologica*, vol. 104, no. 1, pp. 85–91, 2002.
- [13] C. P. Marques, M. C.-J. Cheeran, J. M. Palmquist, S. Hu, S. L. Urban, and J. R. Lokensgard, "Prolonged microglial cell activation and lymphocyte infiltration following experimental herpes encephalitis," *Journal of Immunology*, vol. 181, no. 9, pp. 6417–6426, 2008.
- [14] I. Bartholomäus, N. Kawakami, F. Odoardi et al., "Effector T cell interactions with meningeal vascular structures in nascent autoimmune CNS lesions," *Nature*, vol. 462, no. 7269, pp. 94–98, 2009.
- [15] F. Masson, T. Calzascia, W. Di Berardino-Besson, N. De Tribolet, P.-Y. Dietrich, and P. R. Walker, "Brain microenvironment promotes the final functional maturation of tumor-specific effector CD8+ T cells," *Journal of Immunology*, vol. 179, no. 2, pp. 845–853, 2007.
- [16] H. Lauterbach, E. I. Zuniga, P. Truong, M. B. A. Oldstone, and D. B. McGavern, "Adoptive immunotherapy induces CNS dendritic cell recruitment and antigen presentation during clearance of a persistent viral infection," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 203, no. 8, pp. 1963–1975, 2006.
- [17] S. Saikali, T. Avril, B. Collet et al., "Expression of nine tumour antigens in a series of human glioblastoma multiforme: interest of EGFRvIII, IL-13R α 2, gp100 and TRP-2 for immunotherapy," *Journal of Neuro-Oncology*, vol. 81, no. 2, pp. 139–148, 2007.
- [18] H. Okada, G. Kohanbash, X. Zhu et al., "Immunotherapeutic approaches for glioma," *Critical Reviews in Immunology*, vol. 29, no. 1, pp. 1–42, 2009.
- [19] R. Ueda, K. L. Low, X. Zhu et al., "Spontaneous immune responses against glioma-associated antigens in a long term survivor with malignant glioma," *Journal of Translational Medicine*, vol. 5, Article ID 68, 2007.
- [20] M. Mittelbronn, P. Simon, C. Löffler et al., "Elevated HLA-E levels in human glioblastomas but not in grade I to III astrocytomas correlate with infiltrating CD8+ cells," *Journal of Neuroimmunology*, vol. 189, no. 1–2, pp. 50–58, 2007.

- [21] C. Barcia Jr., A. Gómez, J. M. Gallego-Sanchez et al., "Infiltrating CTLs in human glioblastoma establish immunological synapses with tumorigenic cells," *American Journal of Pathology*, vol. 175, no. 2, pp. 786–798, 2009.
- [22] A. Waziri, B. Killory, A. T. Ogden III et al., "Preferential in situ CD4+CD56+ T cell activation and expansion within human glioblastoma," *Journal of Immunology*, vol. 180, no. 11, pp. 7673–7680, 2008.
- [23] S. K. Jacobs, D. J. Wilson, P. L. Kornblith, and E. A. Grimm, "Interleukin-2 or autologous lymphokine-activated killer cell treatment of malignant glioma: phase I trial," *Cancer Research*, vol. 46, no. 4, part 2, pp. 2101–2104, 1986.
- [24] R. E. Merchant, A. J. Grant, L. H. Merchant, and H. F. Young, "Adoptive immunotherapy for recurrent glioblastoma multiforme using lymphokine activated killer cells and recombinant interleukin-2," *Cancer*, vol. 62, no. 4, pp. 665–671, 1988.
- [25] D. Barba, S. C. Saris, C. Holder, S. A. Rosenberg, and E. H. Oldfield, "Intratumoral LAK cell and interleukin-2 therapy of human gliomas," *Journal of Neurosurgery*, vol. 70, no. 2, pp. 175–182, 1989.
- [26] K. O. Lillehei, D. H. Mitchell, S. D. Johnson, E. L. McCleary, and C. A. Kruse, "Long-term follow-up of patients with recurrent malignant gliomas treated with adjuvant adoptive immunotherapy," *Neurosurgery*, vol. 28, no. 1, pp. 16–23, 1991.
- [27] E. W. B. Jeffes III, Y. B. Beamer, S. Jacques et al., "Therapy of recurrent high grade gliomas with surgery, and autologous mitogen activated IL-2 stimulated killer (MAK) lymphocytes: I. Enhancement of MAK lytic activity and cytokine production by PHA and clinical use of PHA," *Journal of Neuro-Oncology*, vol. 15, no. 2, pp. 141–155, 1993.
- [28] A. Blancher, F. Roubinet, A. S. Grancher et al., "Local immunotherapy of recurrent glioblastoma multiforme by intracerebral perfusion of interleukin-2 and LAK cells," *European Cytokine Network*, vol. 4, no. 5, pp. 331–341, 1993.
- [29] A. Boiardi, A. Silvani, P. A. Ruffini et al., "Loco-regional immunotherapy with recombinant interleukin-2 and adherent lymphokine-activated killer cells (A-LAK) in recurrent glioblastoma patients," *Cancer Immunology Immunotherapy*, vol. 39, no. 3, pp. 193–197, 1994.
- [30] R. L. Hayes, M. Koslow, E. M. Hiesiger et al., "Improved long term survival after intracavitary interleukin-2 and lymphokine-activated killer cells for adults with recurrent malignant glioma," *Cancer*, vol. 76, no. 5, pp. 840–852, 1995.
- [31] S. K. Sankhla, J. S. Nadkarni, and S. N. Bhagwati, "Adoptive immunotherapy using lymphokine-activated killer (LAK) cells and interleukin-2 for recurrent malignant primary brain tumors," *Journal of Neuro-Oncology*, vol. 27, no. 2, pp. 133–140, 1995.
- [32] R. L. Hayes, E. Arbit, M. Odaimi et al., "Adoptive cellular immunotherapy for the treatment of malignant gliomas," *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, vol. 39, no. 1–2, pp. 31–42, 2001.
- [33] R. O. Dillman, C. M. Duma, P. M. Schiltz et al., "Intracavitary placement of autologous lymphokine-activated killer (LAK) cells after resection of recurrent glioblastoma," *Journal of Immunotherapy*, vol. 27, no. 5, pp. 398–404, 2004.
- [34] R. O. Dillman, C. M. Duma, R. A. Ellis et al., "Intralesional lymphokine-activated killer cells as adjuvant therapy for primary glioblastoma," *Journal of Immunotherapy*, vol. 32, no. 9, pp. 914–919, 2009.
- [35] T. Kitahara, O. Watanabe, and A. Yamaura, "Establishment of interleukin 2 dependent cytotoxic T lymphocyte cell line specific for autologous brain tumor and its intracranial administration for therapy of the tumor," *Journal of Neuro-Oncology*, vol. 4, no. 4, pp. 329–336, 1987.
- [36] H. Tsurushima, S. Q. Liu, K. Tsuboi et al., "Reduction of end-stage malignant glioma by injection with autologous cytotoxic T lymphocytes," *Japanese Journal of Cancer Research*, vol. 90, no. 5, pp. 536–545, 1999.
- [37] K. Tsuboi, K. Saijo, E. Ishikawa et al., "Effects of local injection of ex vivo expanded autologous tumor-specific T lymphocytes in cases with recurrent malignant gliomas," *Clinical Cancer Research*, vol. 9, no. 9, pp. 3294–3302, 2003.
- [38] C. A. Kruse, L. Cepeda, B. Owens, S. D. Johnson, J. Stears, and K. O. Lillehei, "Treatment of recurrent glioma with intracavitary alloreactive cytotoxic T lymphocytes and interleukin-2," *Cancer Immunology Immunotherapy*, vol. 45, no. 2, pp. 77–87, 1997.
- [39] K. B. Quattrocchi, C. H. Miller, S. Cush et al., "Pilot study of local autologous tumor infiltrating lymphocytes for the treatment of recurrent malignant gliomas," *Journal of Neuro-Oncology*, vol. 45, no. 2, pp. 141–157, 1999.
- [40] F. P. Holladay, T. Heitz-Turner, W. L. Bayer, and G. W. Wood, "Autologous tumor cell vaccination combined with adoptive cellular immunotherapy in patients with Grade III/IV astrocytoma," *Journal of Neuro-Oncology*, vol. 27, no. 2, pp. 179–189, 1996.
- [41] G. E. Plautz, G. H. Barnett, D. W. Miller et al., "Systemic T cell adoptive immunotherapy of malignant gliomas," *Journal of Neurosurgery*, vol. 89, no. 1, pp. 42–51, 1998.
- [42] G. E. Plautz, D. W. Miller, G. H. Barnett et al., "T cell adoptive immunotherapy of newly diagnosed gliomas," *Clinical Cancer Research*, vol. 6, no. 6, pp. 2209–2218, 2000.
- [43] G. W. Wood, F. P. Holladay, T. Turner, Y.-Y. Wang, and M. Chiga, "A pilot study of autologous cancer cell vaccination and cellular immunotherapy using anti-CD3 stimulated lymphocytes in patients with recurrent grade III/IV astrocytoma," *Journal of Neuro-Oncology*, vol. 48, no. 2, pp. 113–120, 2000.
- [44] A. E. Sloan, R. Dansey, L. Zamorano et al., "Adoptive immunotherapy in patients with recurrent malignant glioma: preliminary results of using autologous whole-tumor vaccine plus granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and adoptive transfer of anti-CD3-activated lymphocytes," *Neurosurgical Focus*, vol. 9, no. 6, p. e9, 2000.
- [45] G. Parmiani, C. Castelli, L. Pilla, M. Santinami, M. P. Colombo, and L. Rivoltini, "Opposite immune functions of GM-CSF administered as vaccine adjuvant in cancer patients," *Annals of Oncology*, vol. 18, no. 2, pp. 226–232, 2007.
- [46] R. E. Sobol, H. Fakhrai, D. Shawler et al., "Interleukin-2 gene therapy in a patient with glioblastoma," *Gene Therapy*, vol. 2, no. 2, pp. 164–167, 1995.
- [47] T. Schneider, R. Gerhards, E. Kirches, and R. Firsching, "Preliminary results of active specific immunization with modified tumor cell vaccine in glioblastoma multiforme," *Journal of Neuro-Oncology*, vol. 53, no. 1, pp. 39–46, 2001.
- [48] D. W. Andrews, M. Resnicoff, A. E. Flanders et al., "Results of a pilot study involving the use of an antisense oligodeoxynucleotide directed against the insulin-like growth factor type I receptor in malignant astrocytomas," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 19, no. 8, pp. 2189–2200, 2001.
- [49] H. Okada, F. S. Lieberman, H. D. Edington et al., "Autologous glioma cell vaccine admixed with interleukin-4 gene transfected fibroblasts in the treatment of recurrent glioblastoma: Preliminary observations in a patient with a favorable

- response to therapy," *Journal of Neuro-Oncology*, vol. 64, no. 1-2, pp. 13-20, 2003.
- [50] H. H. Steiner, M. M. Bonsanto, P. Beckhove et al., "Antitumor vaccination of patients with glioblastoma multiforme: a pilot study to assess feasibility, safety, and clinical benefits," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 22, no. 21, pp. 4272-4281, 2004.
- [51] I. F. Parney, L.-J. Chang, M. A. Farr-Jones, C. Hao, M. Smylie, and K. C. Petruk, "Technical hurdles in a pilot clinical trial of combined B7-2 and GM-CSF immunogene therapy for glioblastomas and melanomas," *Journal of Neuro-Oncology*, vol. 78, no. 1, pp. 71-80, 2006.
- [52] E. Ishikawa, K. Tsuboi, T. Yamamoto et al., "Clinical trial of autologous formalin-fixed tumor vaccine for glioblastoma multiforme patients," *Cancer Science*, vol. 98, no. 8, pp. 1226-1233, 2007.
- [53] A. Clavreul, N. Piard, J.-Y. Tanguy et al., "Autologous tumor cell vaccination plus infusion of GM-CSF by a programmable pump in the treatment of recurrent malignant gliomas," *Journal of Clinical Neuroscience*, vol. 17, no. 7, pp. 842-848, 2010.
- [54] L. M. Liao, K. L. Black, N. A. Martin et al., "Treatment of a patient by vaccination with autologous dendritic cells pulsed with allogeneic major histocompatibility complex class I-matched tumor peptides. Case report," *Neurosurgical Focus*, vol. 9, no. 6, p. e8, 2000.
- [55] T. Kikuchi, Y. Akasaki, M. Irie, S. Homma, T. Abe, and T. Ohno, "Results of a phase I clinical trial of vaccination of glioma patients with fusions of dendritic and glioma cells," *Cancer Immunology, Immunotherapy*, vol. 50, no. 7, pp. 337-344, 2001.
- [56] J. S. Yu, C. J. Wheeler, P. M. Zeltzer et al., "Vaccination of malignant glioma patients with peptide-pulsed dendritic cells elicits systemic cytotoxicity and intracranial T-cell infiltration," *Cancer Research*, vol. 61, no. 3, pp. 842-847, 2001.
- [57] R. Yamanaka, T. Abe, N. Yajima et al., "Vaccination of recurrent glioma patients with tumour lysate-pulsed dendritic cells elicits immune responses: results of a clinical phase I/II trial," *British Journal of Cancer*, vol. 89, no. 7, pp. 1172-1179, 2003.
- [58] S. De Vleeschouwer, F. Van Calenbergh, P. Demaerel et al., "Transient local response and persistent tumor control in a child with recurrent malignant glioma: treatment with combination therapy including dendritic cell therapy: case report," *Journal of Neurosurgery*, vol. 100, no. 5, supplement, pp. 492-497, 2004.
- [59] J. S. Yu, G. Liu, H. Ying, W. H. Yong, K. L. Black, and C. J. Wheeler, "Vaccination with tumor lysate-pulsed dendritic cells elicits antigen-specific, cytotoxic T-cells in patients with malignant glioma," *Cancer Research*, vol. 64, no. 14, pp. 4973-4979, 2004.
- [60] D. A. Caruso, L. M. Orme, A. M. Neale et al., "Results of a phase I study utilizing monocyte-derived dendritic cells pulsed with tumor RNA in children and young adults with brain cancer," *Neuro-Oncology*, vol. 6, no. 3, pp. 236-246, 2004.
- [61] S. Rutkowski, S. De Vleeschouwer, E. Kaempgen et al., "Surgery and adjuvant dendritic cell-based tumour vaccination for patients with relapsed malignant glioma, a feasibility study," *British Journal of Cancer*, vol. 91, no. 9, pp. 1656-1662, 2004.
- [62] C. J. Wheeler, A. Das, G. Liu, J. S. Yu, and K. L. Black, "Clinical responsiveness of glioblastoma multiforme to chemotherapy after vaccination," *Clinical Cancer Research*, vol. 10, no. 16, pp. 5316-5326, 2004.
- [63] T. Kikuchi, Y. Akasaki, T. Abe et al., "Vaccination of glioma patients with fusions of dendritic and glioma cells and recombinant human interleukin 12," *Journal of Immunotherapy*, vol. 27, no. 6, pp. 452-459, 2004.
- [64] L. M. Liao, R. M. Prins, S. M. Kiertscher et al., "Dendritic cell vaccination in glioblastoma patients induces systemic and intracranial T-cell responses modulated by the local central nervous system tumor microenvironment," *Clinical Cancer Research*, vol. 11, no. 15, pp. 5515-5525, 2005.
- [65] R. Yamanaka, J. Homma, N. Yajima et al., "Clinical evaluation of dendritic cell vaccination for patients with recurrent glioma: Results of a clinical phase I/II trial," *Clinical Cancer Research*, vol. 11, no. 11, pp. 4160-4167, 2005.
- [66] H. Okada, F. S. Lieberman, K. A. Walter et al., "Autologous glioma cell vaccine admixed with interleukin-4 gene transfected fibroblasts in the treatment of patients with malignant gliomas," *Journal of Translational Medicine*, vol. 5, Article ID 67, 2007.
- [67] D. G. Walker, R. Laherty, F. H. Tomlinson, T. Chuah, and C. Schmidt, "Results of a phase I dendritic cell vaccine trial for malignant astrocytoma: potential interaction with adjuvant chemotherapy," *Journal of Clinical Neuroscience*, vol. 15, no. 2, pp. 114-121, 2008.
- [68] C. J. Wheeler, K. L. Black, G. Liu et al., "Vaccination elicits correlated immune and clinical responses in glioblastoma multiforme patients," *Cancer Research*, vol. 68, no. 14, pp. 5955-5964, 2008.
- [69] S. De Vleeschouwer, S. Fieuws, S. Rutkowski et al., "Post-operative adjuvant dendritic cell-based immunotherapy in patients with relapsed glioblastoma multiforme," *Clinical Cancer Research*, vol. 14, no. 10, pp. 3098-3104, 2008.
- [70] J. H. Sampson, G. E. Archer, D. A. Mitchell et al., "An epidermal growth factor receptor variant III-targeted vaccine is safe and immunogenic in patients with glioblastoma multiforme," *Molecular Cancer Therapeutics*, vol. 8, no. 10, pp. 2773-2779, 2009.
- [71] H. Ardon, S. De Vleeschouwer, F. Van Calenbergh et al., "Adjuvant dendritic cell-based tumour vaccination for children with malignant brain tumours," *Pediatric Blood and Cancer*, vol. 54, no. 4, pp. 519-525, 2010.
- [72] H. Ardon, S. Van Gool, I. S. Lopes et al., "Integration of autologous dendritic cell-based immunotherapy in the primary treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme: a pilot study," *Journal of Neurooncology*, vol. 99, no. 2, pp. 261-272, 2010.
- [73] S. A. Rosenberg, J. C. Yang, and N. P. Restifo, "Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines," *Nature Medicine*, vol. 10, no. 9, pp. 909-915, 2004.
- [74] P. Y. Wen, D. R. Macdonald, D. A. Reardon et al., "Updated response assessment criteria for high-grade gliomas: response assessment in neuro-oncology working group," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 28, no. 11, pp. 1963-1972, 2010.
- [75] R. Stupp and F. Roila, "Malignant glioma: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up," *Annals of Oncology*, vol. 20, supplement 4, pp. 126-128, 2009.
- [76] L. Bauchet, H. Mathieu-Daudé, P. Fabbro-Peray et al., "Oncological patterns of care and outcome for 952 patients with newly diagnosed glioblastoma in 2004," *Journal of Neurooncology*. In press.

- [77] M. Weller, R. Stupp, G. Reifenberger et al., "MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine?" *Nature Reviews Neurology*, vol. 6, no. 1, pp. 39–51, 2010.
- [78] L. Karayan-Tapon, V. Quillien, J. Guilhot et al., "Prognostic value of O6-methylguanine-DNA methyltransferase status in glioblastoma patients, assessed by five different methods," *Journal of Neuro-Oncology*, vol. 97, no. 3, pp. 311–322, 2010.
- [79] M. R. Graf, R. M. Prins, W. T. Hawkins, and R. E. Merchant, "Irradiated tumor cell vaccine for treatment of an established glioma. I. Successful treatment with combined radiotherapy and cellular vaccination," *Cancer Immunology, Immunotherapy*, vol. 51, no. 4, pp. 179–189, 2002.
- [80] J. Kjaergaard, L.-X. Wang, H. Kuriyama, S. Shu, and G. E. Plautz, "Active immunotherapy for advanced intracranial murine tumors by using dendritic cell-tumor cell fusion vaccines," *Journal of Neurosurgery*, vol. 103, no. 1, pp. 156–164, 2005.
- [81] E. A. Reits, J. W. Hodge, C. A. Herberts et al., "Radiation modulates the peptide repertoire, enhances MHC class I expression, and induces successful antitumor immunotherapy," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 203, no. 5, pp. 1259–1271, 2006.
- [82] C. Banissi, F. Ghiringhelli, L. Chen, and A. F. Carpentier, "Treg depletion with a low-dose metronomic temozolomide regimen in a rat glioma model," *Cancer Immunology, Immunotherapy*, vol. 58, no. 10, pp. 1627–1634, 2009.
- [83] T.-G. Kim, C.-H. Kim, J.-S. Park et al., "Immunological factors relating to the antitumor effect of temozolomide chemoimmunotherapy in a murine glioma model," *Clinical and Vaccine Immunology*, vol. 17, no. 1, pp. 143–153, 2010.
- [84] J. T. Jordan, W. Sun, S. F. Hussain, G. DeAngulo, S. S. Prabhu, and A. B. Heimberger, "Preferential migration of regulatory T cells mediated by glioma-secreted chemokines can be blocked with chemotherapy," *Cancer Immunology, Immunotherapy*, vol. 57, no. 1, pp. 123–131, 2008.
- [85] M. P. Gustafson, Y. Lin, and K. C. New, "Systemic immune suppression in glioblastoma: the interplay between CD14+HLA-DRlo/neg monocytes, tumor factors, and dexamethasone," *Journal of Neurooncology*. In press.
- [86] S. A. Rosenberg and M. E. Dudley, "Adoptive cell therapy for the treatment of patients with metastatic melanoma," *Current Opinion in Immunology*, vol. 21, no. 2, pp. 233–240, 2009.
- [87] C. H. June, B. R. Blazar, and J. L. Riley, "Engineering lymphocyte subsets: tools, trials and tribulations," *Nature Reviews Immunology*, vol. 9, no. 11, pp. 704–716, 2009.
- [88] W. W. Overwijk, M. R. Theoret, S. E. Finkelstein et al., "Tumor regression and autoimmunity after reversal of a functionally tolerant state of self-reactive CD8+ T cells," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 198, no. 4, pp. 569–580, 2003.
- [89] R. C. Anderson, J. B. Elder, M. D. Brown et al., "Changes in the immunologic phenotype of human malignant glioma cells after passaging in vitro," *Clinical Immunology*, vol. 102, no. 1, pp. 84–95, 2002.
- [90] U. Herrlinger, S. Aulwurm, H. Strik, S. Weit, U. Naumann, and M. Weller, "MIP-1 α antagonizes the effect of a GM-CSF-enhanced subcutaneous vaccine in a mouse glioma model," *Journal of Neuro-Oncology*, vol. 66, no. 1-2, pp. 147–154, 2004.
- [91] W. C. Jean, S. R. Spellman, M. A. Wallenfriedman et al., "Effects of combined granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), interleukin-2, and interleukin-12 based immunotherapy against intracranial glioma in the rat," *Journal of Neuro-Oncology*, vol. 66, no. 1-2, pp. 39–49, 2004.
- [92] R. Soiffer, T. Lynch, M. Mihm et al., "Vaccination with irradiated autologous melanoma cells engineered to secrete human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor generates potent antitumor immunity in patients with metastatic melanoma," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, no. 22, pp. 13141–13146, 1998.
- [93] M. B. Faries, E. C. Hsueh, X. Ye, M. Hoban, and D. L. Morton, "Effect of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor on vaccination with an allogeneic whole-cell melanoma vaccine," *Clinical Cancer Research*, vol. 15, no. 22, pp. 7029–7035, 2009.
- [94] C. L. Slingluff Jr., G. R. Petroni, W. C. Olson et al., "Effect of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor on circulating CD8+ and CD4+ T-cell responses to a multipptide melanoma vaccine: outcome of a multicenter randomized trial," *Clinical Cancer Research*, vol. 15, no. 22, pp. 7036–7044, 2009.
- [95] I. Marigo, E. Bosio, S. Solito et al., "Tumor-induced tolerance and immune suppression depend on the C/EBP β transcription factor," *Immunity*, vol. 32, no. 6, pp. 790–802, 2010.
- [96] V. Murthy, A. Moiyadi, R. Sawant, and R. Sarin, "Clinical considerations in developing dendritic cell vaccine based immunotherapy protocols in cancer," *Current Molecular Medicine*, vol. 9, no. 6, pp. 725–731, 2009.
- [97] P. Kalinski, J. Urban, R. Narang, E. Berk, E. Wiekowski, and R. Muthuswamy, "Dendritic cell-based therapeutic cancer vaccines: what we have and what we need," *Future Oncology*, vol. 5, no. 3, pp. 379–390, 2009.
- [98] E. Gilboa, "DC-based cancer vaccines," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 117, no. 5, pp. 1195–1203, 2007.
- [99] S. Van Gool, W. Maes, H. Ardon, T. Verschuere, S. Van Cauter, and S. De Vleeschouwer, "Dendritic cell therapy of high-grade gliomas," *Brain Pathology*, vol. 19, no. 4, pp. 694–712, 2009.
- [100] C. J. Wheeler, "Dendritic cell vaccines to combat glioblastoma," *Expert Review of Neurotherapeutics*, vol. 10, no. 4, pp. 483–486, 2010.
- [101] R. Yamanaka, "Dendritic-cell- and peptide-based vaccination strategies for glioma," *Neurosurgical Review*, vol. 32, no. 3, pp. 265–273, 2009.
- [102] R. Stupp and M. E. Hegi, "Targeting brain-tumor stem cells," *Nature Biotechnology*, vol. 25, no. 2, pp. 193–194, 2007.
- [103] N. Ahmed, V. S. Salsman, Y. Kew et al., "HER2-specific T cells target primary glioblastoma stem cells and induce regression of autologous experimental tumors," *Clinical Cancer Research*, vol. 16, no. 2, pp. 474–485, 2010.
- [104] R. B. Mailliard, A. Wankowicz-Kalinska, Q. Cai et al., "α-type-1 polarized dendritic cells: a novel immunization tool with optimized CTL-inducing activity," *Cancer Research*, vol. 64, no. 17, pp. 5934–5937, 2004.
- [105] M. Fujita, X. Zhu, R. Ueda et al., "Effective immunotherapy against murine gliomas using type 1 polarizing dendritic cells-significant roles of CXCL10," *Cancer Research*, vol. 69, no. 4, pp. 1587–1595, 2009.
- [106] C. S. Higano, E. J. Small, P. Schellhammer et al., "Sipuleucel-T," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 9, no. 7, pp. 513–514, 2010.
- [107] V. Quillien, A. Moisan, A. Carsin et al., "Biodistribution of radiolabelled human dendritic cells injected by various

- routes," *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, vol. 32, no. 7, pp. 731–741, 2005.
- [108] I. J. M. De Vries, W. J. Lesterhuis, J. O. Barentsz et al., "Magnetic resonance tracking of dendritic cells in melanoma patients for monitoring of cellular therapy," *Nature Biotechnology*, vol. 23, no. 11, pp. 1407–1413, 2005.
- [109] P. Verdijk, E. H. J. G. Aarntzen, W. J. Lesterhuis et al., "Limited amounts of dendritic cells migrate into the cell area of lymph nodes but have high immune activating potential in melanoma patients," *Clinical Cancer Research*, vol. 15, no. 7, pp. 2531–2540, 2009.
- [110] S. Pellegatta, P. L. Poliani, E. Stucchi et al., "Intra-tumoral dendritic cells increase efficacy of peripheral vaccination by modulation of glioma microenvironment," *Neuro-Oncology*, vol. 12, no. 4, pp. 377–388, 2010.
- [111] L. A. Morford, L. H. Elliott, S. L. Carlson, W. H. Brooks, and T. L. Roszman, "T cell receptor-mediated signaling is defective in T cells obtained from patients with primary intracranial tumors," *Journal of Immunology*, vol. 159, no. 9, pp. 4415–4425, 1997.
- [112] A. R. Dix, W. H. Brooks, T. L. Roszman, and L. A. Morford, "Immune defects observed in patients with primary malignant brain tumors," *Journal of Neuroimmunology*, vol. 100, no. 1–2, pp. 216–232, 1999.
- [113] P. E. Fecci, D. A. Mitchell, J. F. Whitesides et al., "Increased regulatory T-cell fraction amidst a diminished CD4 compartment explains cellular immune defects in patients with malignant glioma," *Cancer Research*, vol. 66, no. 6, pp. 3294–3302, 2006.
- [114] S. F. Hussain, D. Yang, D. Suki, E. Grimm, and A. B. Heimberger, "Innate immune functions of microglia isolated from human glioma patients," *Journal of Translational Medicine*, vol. 4, Article ID 15, 2006.
- [115] C. Wójcicki, K. Asadullah, D. Nestler et al., "Diminished monocytic HLA-DR expression and ex vivo cytokine secretion capacity in patients with glioblastoma: effect of tumor extirpation," *Journal of Neuroimmunology*, vol. 84, no. 2, pp. 164–171, 1998.
- [116] J.-P. Zou, L. A. Morford, C. Choungnet et al., "Human glioma-induced immunosuppression involves soluble factor(s) that alters monocyte cytokine profile and surface markers," *Journal of Immunology*, vol. 162, no. 8, pp. 4882–4892, 1999.
- [117] A. T. Ogden, D. Horgan, A. Waziri et al., "Defective receptor expression and dendritic cell differentiation of monocytes in glioblastomas," *Neurosurgery*, vol. 59, no. 4, pp. 902–909, 2006.
- [118] S. Bodmer, K. Strommer, K. Frei et al., "Immunosuppression and transforming growth factor- β in glioblastoma. Preferential production of transforming growth factor- β 2," *Journal of Immunology*, vol. 143, no. 10, pp. 3222–3229, 1989.
- [119] M. C. Kuppner, M.-F. Hamou, Y. Sawamura, S. Bodmer, and N. De Tribolet, "Inhibition of lymphocyte function by glioblastoma-derived transforming growth factor β 2," *Journal of Neurosurgery*, vol. 71, no. 2, pp. 211–217, 1989.
- [120] M. C. Kuppner, Y. Sawamura, M.-F. Hamou, and N. De Tribolet, "Influence of PGE2- and cAMP-modulating agents on human glioblastoma cell killing interleukin-2-activated lymphocytes," *Journal of Neurosurgery*, vol. 72, no. 4, pp. 619–625, 1990.
- [121] W. T. Coudwell, P. Dore-Duffy, M. L. J. Apuzzo, and J. P. Antel, "Malignant glioma modulation of immune function: relative contribution of different soluble factors," *Journal of Neuroimmunology*, vol. 33, no. 2, pp. 89–96, 1991.
- [122] T. Nitta, M. Hishii, K. Sato, and K. Okumura, "Selective expression of interleukin-10 gene within glioblastoma multiforme," *Brain Research*, vol. 649, no. 1–2, pp. 122–128, 1994.
- [123] M. Hishii, T. Nitta, H. Ishida et al., "Human glioma-derived interleukin-10 inhibits antitumor immune responses in vitro," *Neurosurgery*, vol. 37, no. 6, pp. 1160–1166, 1995.
- [124] J. Wischhusen, G. Jung, I. Radovanovic et al., "Identification of CD70-mediated apoptosis of immune effector cells as a novel immune escape pathway of human glioblastoma," *Cancer Research*, vol. 62, no. 9, pp. 2592–2599, 2002.
- [125] A. Chaharvi, P. Rayman, A. L. Richmond et al., "Glioblastomas induce T-lymphocyte death by two distinct pathways involving gangliosides and CD70," *Cancer Research*, vol. 65, no. 12, pp. 5428–5438, 2005.
- [126] P. Saas, P. R. Walker, M. Hahne et al., "Fas ligand expression by astrocytoma in vivo: maintaining immune privilege in the brain?" *Journal of Clinical Investigation*, vol. 99, no. 6, pp. 1173–1178, 1997.
- [127] M. Weller, C. Weinstock, C. Will et al., "CD95-dependent T-cell killing by glioma cells expressing CD95 ligand: more on tumor immune escape, the CD95 counterattack, and the immune privilege of the brain," *Cellular Physiology and Biochemistry*, vol. 7, no. 5, pp. 282–288, 1997.
- [128] P. R. Walker, P. Saas, and P. Y. Dietrich, "Role of Fas ligand (CD95L) in immune escape: the tumor cell strikes back," *Journal of Immunology*, vol. 158, no. 10, pp. 4521–4524, 1997.
- [129] H. Wiendl, M. Mitsdoerffer, V. Hofmeister et al., "A functional role of HLA-G expression in human gliomas: an alternative strategy of immune escape," *Journal of Immunology*, vol. 168, no. 9, pp. 4772–4780, 2002.
- [130] S. Wintterle, B. Schreiner, M. Mitsdoerffer et al., "Expression of the B7-related molecule B7-H1 by glioma cells: a potential mechanism of immune paralysis," *Cancer Research*, vol. 63, no. 21, pp. 7462–7467, 2003.
- [131] R. Wilmotte, K. Burkhardt, V. Kindler et al., "B7-homolog I expression by human glioma: a new mechanism of immune evasion," *NeuroReport*, vol. 16, no. 10, pp. 1081–1085, 2005.
- [132] T. Avril, S. Saikali, E. Vauleon et al., "Distinct effects of human glioblastoma immunoregulatory molecules programmed cell death ligand-1 (PDL-1) and indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) on tumour-specific T cell functions," *Journal of Neuroimmunology*, vol. 225, no. 1–2, pp. 22–33, 2010.
- [133] R. Grant and V. Kapoor, "Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase activity in IFN- γ stimulated astroglia cells decreases intracellular NAD levels," *Biochemical Pharmacology*, vol. 66, no. 6, pp. 1033–1036, 2003.
- [134] T. Miyazaki, K. Moritake, K. Yamada et al., "Indoleamine 2,3-dioxygenase as a new target for malignant glioma therapy: laboratory investigation," *Journal of Neurosurgery*, vol. 111, no. 2, pp. 230–237, 2009.
- [135] M. Weller and A. Fontana, "The failure of current immunotherapy for malignant glioma. Tumor-derived TGF- β , T-cell apoptosis, and the immune privilege of the brain," *Brain Research Reviews*, vol. 21, no. 2, pp. 128–151, 1995.
- [136] A. El Andaloussi and M. S. Lesniak, "An increase in CD4+ CD25+FOXP3+ regulatory T cells in tumor-infiltrating lymphocytes of human glioblastoma multiforme," *Neuro-Oncology*, vol. 8, no. 3, pp. 234–243, 2006.
- [137] A. B. Heimberger, W. Sun, S. F. Hussain et al., "Immunological responses in a patient with glioblastoma multiforme treated with sequential courses of temozolomide and immunotherapy: case study," *Neuro-Oncology*, vol. 10, no. 1, pp. 98–103, 2008.

- [138] D. I. Gabrilovich and S. Nagaraj, "Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system," *Nature Reviews Immunology*, vol. 9, no. 3, pp. 162–174, 2009.
- [139] Z.-F. Jia, Q. Huang, C.-S. Kang et al., "Overexpression of septin 7 suppresses glioma cell growth," *Journal of Neuro-Oncology*, vol. 98, no. 3, pp. 329–340, 2010.
- [140] F. S. Hodi, S. J. O'Day, D. F. McDermott et al., "Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma," *The New England Journal of Medicine*, vol. 363, no. 8, pp. 711–723, 2010.
- [141] A. Ribas, B. Comin-Anduix, B. Chmielowski et al., "Dendritic cell vaccination combined with CTLA4 blockade in patients with metastatic melanoma," *Clinical Cancer Research*, vol. 15, no. 19, pp. 6267–6276, 2009.
- [142] F. Ghiringhelli, N. Larmonier, E. Schmitt et al., "CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative," *European Journal of Immunology*, vol. 34, no. 2, pp. 336–344, 2004.
- [143] M. A. Morse, A. C. Hobeika, T. Osada et al., "Depletion of human regulatory T cells specifically enhances antigen-specific immune responses to cancer vaccines," *Blood*, vol. 112, no. 3, pp. 610–618, 2008.
- [144] R. Ueda, M. Fujita, X. Zhu et al., "Systemic inhibition of transforming growth factor- β in glioma-bearing mice improves the therapeutic efficacy of glioma-associated antigen peptide vaccines," *Clinical Cancer Research*, vol. 15, no. 21, pp. 6551–6559, 2009.
- [145] W. Maes, G. G. Rosas, B. Verbrinnen et al., "DC vaccination with anti-CD25 treatment leads to long-term immunity against experimental glioma," *Neuro-Oncology*, vol. 11, no. 5, pp. 529–542, 2009.



Mechanisms of immunomodulation in human glioblastoma

Glioblastoma multiforme (GBM), WHO grade IV astrocytoma, is the most dramatic primary brain cancer with a very poor prognosis due to inevitable disease recurrence. Less than 10% of GBM patients are still alive 5 years after diagnosis despite a multimodal treatment with surgical resection of the tumor, radiation therapy and chemotherapy. Cellular immunotherapy in gliomas, one of the promising new therapies, has shown convincing results in some patients with induction of antitumor immune responses and prolonged survival. In particular, several patients treated with dendritic cell vaccinations have demonstrated systemic antigen-specific cytotoxicity and intratumor infiltration of cytotoxic T cells. However, this is not always correlated with clinical improvement because GBM cells have multiple mechanisms that lead to suppression of the patient's antitumor immune responses. This article will focus on some aspects of the systemic immunosuppression observed in GBM patients as well as the multiple mechanisms of local immunoresistance developed by GBM.

Tony Avril¹,
Elodie Vauleon^{1,2},
Séverine Tanguy-Royer^{1,2},
Jean Mosser² &
Véronique Quillien^{1,2}

¹D  partement de Biologie, Centre
Eugène Marquis, Rue de la bataille
Flandres Dunkerque, CS44229, 35042
Rennes cedex, France
²UMR 6061 CNRS, Université de
Rennes 1, Rennes, France
Author for correspondence:
Tel.: +33 299 253 190
t.avril@rennes.fnclcc.fr

KEYWORDS: glioblastoma • IDO • immunomodulation • PDL1 • regulatory T cells • TGF-  

Immunosuppression at the systemic level

In the past decades, different studies of glioma patients have revealed several systemic immune defects [1]. Abnormal cell number of blood leukocyte populations has been initially reported such as lymphopenia of CD4 T and natural killer (NK) cells [2]. More recently, an increased fraction of Tregs has been observed in the blood of glioma patients [3]. In parallel to these cellular defects, dysregulation of cytokine profiles at the periphery has also been reported in glioma patients, with a shift in the Th1/Th2 cytokine balance in favor of Th2 cytokines, such as IL-10 [2].

Several leukocyte functions are also impaired in glioma patients, such as T- and B-cell proliferation in response to mitogens, B-cell antibody production, T-cell cytokine production and NK cell cytotoxicity [1,2]. Glioma patients' monocytes show a decrease in antigen presentation and cytokine production, and exhibit a particular myeloid-derived suppressive cell (MDSC)-like cell phenotype [1,2].

Early experiments demonstrate that glioma patients' serum, cerebral spinal fluids or cyst fluids from tumors inhibit lymphocyte proliferation [1,2]. Several soluble factors secreted by glioma cells have now been identified as molecules associated with these immune disorders, such as TGF-  , IL-10, PGE₂ and gangliosides.

Immunosuppression at the tumor site

■ Specific immune cell populations recruited by GBM cells

Microglia cells represent a third of the non-tumoral cells within the tumor [4]. The presence of such a large population of microglia cells is related to the production by glioma cells of microglia's chemoattractant MCP1 and growth factors colony-stimulating factor 1, granulocyte colony-stimulating factor and HGF [4]. Microglia cells are a source of metalloproteinases matrix metalloprotease 9 and growth factors EGF and VEGF that support the tumor development linked to migration, proliferation and angiogenesis functions. In addition, glioma-infiltrating microglia cells contribute to the local immunosuppressive microenvironment of the tumor by secreting IL-10 and expressing programmed cell death ligand-1 (PDL1, CD274) and FAS ligand (FASL, CD178) molecules [4].

The presence of Treg at the tumor site has also been described in brain tumors and preferentially in high-grade gliomas, including glioblastoma multiforme (GBM) [5]. Treg recruitment within the tumor is associated with the secretion of CCL2/22 chemokines by glioma cells [5].

More recently, preliminary studies report infiltration of other immunosuppressive cells in brain tumors, such as MDSCs, tumor-infiltrating macrophages and type II NKT cells [1,6]

but their involvement in the local glioma immunosuppression still needs to be clarified.

■ Secreted & membrane immunosuppressive molecules expressed by GBM cells

Locally at the tumor site, GBM cells also express soluble and membrane proteins described as immunosuppressive molecules that inhibit the antitumor effector cell responses. Several secreted molecules have been described, including IL-10, TGF- β , PGE₂ and gangliosides (FIGURE 1) [7]. These molecules act locally at the tumor site as well as in the periphery by inhibiting T, B and NK cell and monocyte functions as described earlier. One of the most studied, TGF- β (originally defined as the glioblastoma cell-derived T-cell suppressor factor) suppresses T-cell proliferation, activation and differentiation into effector cells [7,8].

In addition, the expression of multiple immunosuppressive molecules at the GBM cell surface directly affects the antitumor functions of immune cell effectors, such as cytotoxic CD8 T and NK cells by inducing their inhibition, apoptosis or anergy [8]. CD70 is expressed on human glioma cell lines and induces apoptosis of CD27-expressing T and B cells from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) [9]. FASL is expressed on human malignant glioma cells and induces apoptosis of FAS-expressing T lymphocytes and astrocytoma-infiltrating T cells [10]. HLA-G, a nonclassical MHC class I molecule, has been described in brain tumor tissues and glioma cell lines; HLA-G inhibits cytotoxicity, proliferation and T-cell priming of alloreactive PBMC by direct or indirect (via the HLA-E molecule) interaction with inhibitory receptors expressed on cytotoxic lymphocytes [11].

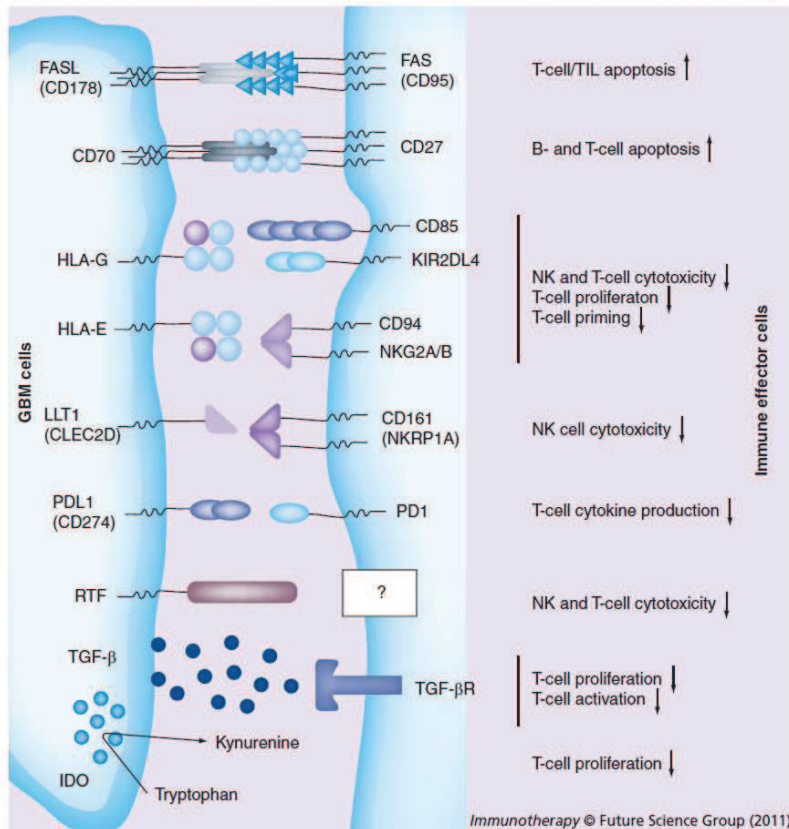


Figure 1. Immunosuppressive molecules expressed on glioblastoma multiforme cells, their molecular targets and actions on immune effector cells.

FASL: FAS ligand; GBM: Glioblastoma multiforme; NK: Natural killer; TIL: Tumor infiltrating lymphocyte.

Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is an intracellular enzyme that degrades tryptophan along the kynurenine pathway. IDO is expressed in gliomas, including GBM, and inhibits T-cell proliferation [8]. Lectin-like transcript 1 (LLT1) is found on glioma cells and inhibits CD161-expressing NK cell cytotoxicity [12]. PDL1 is expressed on glioma and astrocytoma cell lines as well as GBM tissues. Engagement of its receptor PD1 inhibits T-cell functions such as proliferation, cytokine production and cytotoxicity, and promotes apoptosis. PDL1 expressed by GBM cells reduces IFN- γ production of allogenic and antitumor T cells [8,13]. More recently, it has been found that glioma stem-like cells express PDL1, which triggers T-cell apoptosis [14]. Regeneration and tolerance factor (RTF) is expressed in human glioma cells *in vitro* and *in vivo*. RTF inhibits NK and T-cell-mediated cytotoxicity [15]. Finally, it has been proposed that the decrease of MHC I molecules (the molecular targets for T-cell recognition) and the absence of costimulatory molecules at the surface of GBM cells lead to a defect in anti-GBM T-cell responses, that is recognition and activation [7].

Conclusion

Identification and better understanding of these different suppressive mechanisms will increase the efficacy of new immunotherapeutic approaches [16] that will necessarily combine stimulators of antitumor immunity and inhibitors of GBM immunosuppressive molecules.

Acknowledgements

We thank Gwénaële Duval, Michèle Marty and Stéphane Moiteaux for their excellent technical assistance.

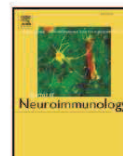
Financial & competing interests disclosure

We thank the organizations that support our work: the 'Ligue Contre le Cancer' Committee of Ille-et-Vilaine and Maine-et-Loire, as well as the Institut National du Cancer and the Cancéropôle Grand-Ouest (the 'From the core to the margin' glioma project), Région Bretagne (GIS Thérapie Cellulaire), and the foundation 'Aidez la recherche'. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Bibliography

- Waziri A: Glioblastoma-derived mechanisms of systemic immunosuppression. *Neurosurg. Clin. N. Am.* 21, 31–42 (2010).
- Dix AR, Brooks WH, Roszman TL, Morford LA: Immune defects observed in patients with primary malignant brain tumors. *J. Neuroimmunol.* 100, 216–232 (1999).
- Fecci PE, Mitchell DA, Whitesides JF *et al.*: Increased regulatory T-cell fraction amidst a diminished CD4 compartment explains cellular immune defects in patients with malignant glioma. *Cancer Res.* 66, 3294–3302 (2006).
- Yang I, Han SJ, Kaur G, Crane C, Parsa AT: The role of microglia in central nervous system immunity and glioma immunology. *J. Clin. Neurosci.* 17, 6–10 (2010).
- Jacobs JF, Idema AJ, Bol KF *et al.*: Prognostic significance and mechanism of Treg infiltration in human brain tumors. *J. Neuroimmunol.* 225, 195–199 (2010).
- Parney IF, Waldron JS, Parsa AT: Flow cytometry and *in vitro* analysis of human glioma-associated macrophages. Laboratory investigation. *J. Neurosurg.* 110, 572–582 (2009).
- Albesiano E, Han JE, Lim M: Mechanisms of local immunoresistance in glioma. *Neurosurg. Clin. N. Am.* 21, 17–29 (2010).
- Avril T, Saikali S, Vauleon E *et al.*: Distinct effects of human glioblastoma immunoregulatory molecules programmed cell death ligand-1 (PDL-1) and indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) on tumour-specific T cell functions. *J. Neuroimmunol.* 225, 22–23 (2010).
- Wischhusen J, Jung G, Radovanovic I *et al.*: Identification of CD70-mediated apoptosis of immune effector cells as a novel immune escape pathway of human glioblastoma. *Cancer Res.* 62, 2592–2599 (2002).
- Walker PR, Saas P, Dietrich PY: Role of Fas ligand (CD95L) in immune escape: the tumor cell strikes back. *J. Immunol.* 158, 4521–4524 (1997).
- Wiendl H, Mitsdoerffer M, Hofmeister V *et al.*: A functional role of HLA-G expression in human gliomas: an alternative strategy of immune escape. *J. Immunol.* 168, 4772–4780 (2002).
- Roth P, Mittelbronn M, Wick W, Meyermann R, Tatagiba M, Weller M: Malignant glioma cells counteract antitumor immune responses through expression of lectin-like transcript-1. *Cancer Res.* 67, 3540–3544 (2007).
- Wilmotte R, Burkhardt K, Kindler V *et al.*: B7-homolog 1 expression by human glioma: a new mechanism of immune evasion. *Neuroreport* 16, 1081–1085 (2005).
- Wei J, Barr J, Kong L-Y *et al.*: Glioma-associated cancer-initiating cells induce immunosuppression. *Clin. Cancer Res.* 16, 461–473 (2010).
- Roth P, Aulwurm S, Gekel I *et al.*: Regeneration and tolerance factor: a novel mediator of glioblastoma-associated immunosuppression. *Cancer Res.* 66, 3852–3858 (2006).
- Vauleon E, Avril T, Collet B, Mosser J, Quillien V: Overview of cellular immunotherapy for patients with glioblastoma. *Clin. Dev. Immunol.* 2010, pii: 689171 (2010).



Distinct effects of human glioblastoma immunoregulatory molecules programmed cell death ligand-1 (PDL-1) and indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) on tumour-specific T cell functions

Tony Avril^{a,*}, Stéphan Saikali^b, Elodie Vauleon^{a,c}, Anne Jary^a, Abderrahmane Hamlat^d, Marie De Tayrac^c, Jean Mosser^c, Véronique Quillien^{a,c}

^a Département de Biologie, Centre Eugène Marquis, Rennes, France

^b Département d'Anatomopathologie, CHU Pontchaillou, Rennes, France

^c UMR 6061 CNRS, Université de Rennes 1, IFR 140, Rennes, France

^d Département de Neurochirurgie, CHU Pontchaillou, Rennes, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 January 2010

Received in revised form 25 March 2010

Accepted 7 April 2010

Keywords:

Glioblastoma

Immunotherapy

PDL-1

IDO

TGF- β

Immunomodulation

T cells

ABSTRACT

Immunotherapy is a promising new treatment for patients suffering from glioma, in particular glioblastoma multiforme (GBM). However, tumour cells use different mechanisms to escape the immune responses induced by the treatment. As many other tumours, gliomas express or secrete several immunosuppressive molecules that regulate immune cell functions. In this study, we first analysed *FasL*, *HLA-G*, *IDO*, *PDL-1* and *TGF- β 1*, *- β 2* and *- β 3* expression by transcriptomic microarray analysis in a series of 20 GBM samples and found respectively 15%, 60%, 85%, 30%, 70%, 80% and 35% of positive specimens. mRNA expression was then confirmed in 10 GBM primary cell lines and 2 immortalised cell lines U251 and U87MG. Furthermore, the protein expression of PDL-1, IDO activity and TGF- β 2 secretion were found on most of the untreated GBM primary cell lines. Remarkably, treatment with IFN- γ increased the PDL-1 cell surface expression and the IDO activity, but reduced the TGF- β 2 secretion of GBM cell lines. We finally analysed the immunosuppressive effects of IDO, PDL-1 and TGF- β 1–3 by measuring IFN- γ production and cell cytotoxicity activity of tumour antigen-specific T cells. PDL-1 partially affected the IFN- γ production of antigen-specific T cells in response to GBM primary cell lines, and IDO inhibited lymphocyte proliferation induced by lectins. None of these molecules directly affected the T cell cytotoxicity function. Due to the functional role of PDL-1 and IDO molecules expressed by GBM cells, one could expect that blocking these molecules in the immunotherapy strategies would reinforce the efficiency of these treatments of GBM patients.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Glioblastoma multiforme, the most common primary brain tumour in adults, is an attractive target for novel therapies regarding its poor prognosis with standard treatment including total surgical resection, radiotherapy and adjuvant chemotherapy (Stupp et al., 2005). Indeed, despite intensive investigations for novel drugs, less than a third of patients survive more than two years (Stupp et al., 2009). Recurrence of GBM occurs most often within few months due to the re-growth of remaining tumour cells that are resistant to both radiotherapeutic and chemotherapeutic agents.

Cellular immunotherapy in gliomas, one of the promising new therapies, has shown convincing results in terms of induction of anti-tumour immune responses and prolonged survival compared with

control groups receiving conventional chemotherapy and radiotherapy (Yamanaka, 2008). In particular, patients treated with dendritic cell vaccinations have demonstrated systemic antigen-specific cytotoxicity and intra-tumour infiltration of cytotoxic T cells (Yamanaka et al., 2003; Kikuchi et al., 2004; Yu et al., 2004; Yamanaka et al., 2005). Liao et al. recently reported that T cell infiltration within the tumour was inversely correlated with the secretion of Transforming Growth Factor-beta 2 (TGF- β 2) by the glioma cells (Liao et al., 2005), highlighting the impact of the immunosuppressive properties of the tumour on the clinical efficiency of the treatment.

Local and systemic immune suppression has been involved in glioma progression (Weller and Fontana, 1995; Walker et al., 2002). TGF- β 2, originally defined as the glioblastoma cell-derived T cell suppressor factor, is a molecule that suppresses T cell growth and inhibits T cell activation and differentiation into effector cells (Gorelik and Flavell, 2002). Several other intracellular, membrane and soluble molecules such as FasL, HLA-G, PDL-1 (for Programmed cell Death Ligand-1, CD274), IDO (for Indoleamine 2,3-DiOxygenase) and TGF- β 1–3 have been described as taking part in this phenomenon. The Fas ligand (FasL,

* Corresponding author. Département de Biologie, Centre Eugène Marquis, Rue de la bataille Flandres Dunkerque, CS44229, 35042 Rennes cedex, France. Tel.: +33 299 253 190. E-mail address: t.avril@rennes.fnclcc.fr (T. Avril).

CD178), which is a member of the TNF family, induces apoptosis in Fas (CD95)-expressing cells (Nagata and Golstein, 1995). Although FasL is expressed by immune cells as a cytotoxic molecule, it is also found on the surface of different types of cancer cells (Walker et al., 1997). FasL is expressed in human malignant glioma cells (Gratas et al., 1997). In addition, FasL expressed on glioma cell lines is active and induces the death of sensitive target cells such as Fas-transfected P815 cells (Saas et al., 1997), JURKAT T cell line (Weller et al., 1997) and T cell lines derived from infiltrating T lymphocytes from astrocytoma (Walker et al., 1997). HLA-G is a non-classical MHC class I molecule mainly expressed on placenta by the trophoblastic cells (Kovats et al., 1990). Although HLA-G mRNA expression has also been found in tumour cells such as melanoma and leukaemia cells, its protein expression is still controversial because of the heterogeneity of the results observed in the different studies (Bainbridge et al., 2001; Chang and Ferrone, 2003). HLA-G can interact directly or indirectly (via the HLA-E molecule) with inhibitory receptors expressed on cytotoxic lymphocytes, which induces the abrogation of effector cell activation (Carosella et al., 2008). Wiendl et al. (2002) describe the expression of HLA-G in brain tumour tissues and glioma cell lines, and demonstrate that cytotoxicity, proliferation and T cell priming of alloreactive PBMC are inhibited by HLA-G. PDL-1 belongs to the B7 family, and is expressed on antigen presenting cells (Greenwald et al., 2005). Engagement of its receptor PD-1 inhibits T cell functions such as proliferation, cytokine production and cytotoxicity, and promotes apoptosis (Freeman et al., 2000; Dong et al., 2002). PDL-1 has been observed on glioma and astrocytoma cell lines, and reduces IFN- γ production of allogeneic T cells (Wintterle et al., 2003; Wilmette et al., 2005). Finally, IDO is an intracellular enzyme that degrades tryptophan along the kynurenine pathway. IDO activity is essential in mouse placenta for preventing the rejection of allogeneic fetuses (Munn et al., 1998). Its activity suppresses T cell activation and proliferation (Munn et al., 1999). IDO expression has also been described in cancer of different origins (Munn and Mellor, 2007; Katz et al., 2008), including gliomas (Uyttenhove et al., 2003) and malignant glioma cell lines (Grant and Kapoor, 2003; Miyazaki et al., 2009), in which both IDO expression and activity have recently been reported. To our knowledge, the effect of glioma cell IDO activity on T cell functions has not been investigated.

While the expression of FasL, HLA-G, PDL-1, IDO and TGF- β 1-3 molecules has been reported in glioma cells, their role in modulating GBM-specific T cell effector functions is not fully understood. This is particularly relevant with regard to cellular immunotherapy, whereby tumour-specific T cells would be generated to specifically kill GBM cells. In this study, we first describe the expression pattern of FasL, HLA-G, PDL-1, IDO and TGF- β 1-3 in a series of 20 GBM specimens using data derived from our previous transcriptomic analysis (de Tayrac et al., 2009). The mRNA expression of these molecules is then analysed in 10 GBM primary cell lines, as well as the immortalised cell lines U251 and U87MG. We then focus on the immunosuppressive effects of PDL-1, IDO and TGF- β 1-3 on GBM-specific CD8 $^{+}$ T cell effector functions, i.e. IFN- γ secretion and cell cytotoxicity in response to GBM primary cell lines. We show that none of these molecules have a direct effect on cell cytotoxicity functions, but we provide evidence that PDL-1 affects GBM-specific CD8 $^{+}$ T cell IFN- γ secretion in response to the tumour, and that GBM expresses functional IDO that inhibits the lectin-induced proliferation of lymphocytes.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and antibodies

All reagents not specified below were purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France). Antibodies against CD3, CD8, HLA-ABC and PDL-1 were obtained from BD Biosciences (Le Pont de Claix, France); Melan-A/HLA-A2 tetramers from Beckman Coulter (Marseille, France); anti-EGFRvIII antibody from Skybio (Bedfordshire,

United Kingdom); anti-IDO antibody from Millipore (St Quentin Fallavier, France); anti-IL13R α 2 antibody from Diaclone (Besançon, France); anti-gp100 and anti-vimentin antibodies from DakoCytomation (Trappes, France); anti-HLA-G from Abcam (Paris, France); purified anti-PDL-1 from Clinisciences (Montrouge, France).

2.2. Tumour samples and cell culture

GBM samples were obtained after informed consent of patients treated at the department of neurosurgery (Rennes University Hospital) in accordance with the local ethical committee. Tumours included in this study were diagnosed histologically as GBM or astrocytoma grade IV according to the WHO criteria.

GBM primary cell lines were obtained from GBM samples. After mechanical dissociation of tumour tissues samples, cells were grown in Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM, Lonza, Verviers, Belgium) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) (Lonza) for 24 h at 37 °C in a humid atmosphere of 5% CO₂. Unattached cells were then removed the day after. When confluence was achieved, cells were trypsinised, washed in PBS and used between the 10th and 20th passages for the experiments. Human trophoblastic cell line JEG-3 and glioblastoma cell lines U251 and U87MG were kindly provided by L. Amiot (Rennes, France), V. Catros (Rennes) and A. Clavreul (Angers, France), respectively. All the immortalised cell lines were cultured in DMEM 10% FCS.

2.3. mRNA preparation, reverse transcriptase (RT)-PCR and electrophoresis

Total RNA extraction was performed using the Rneasy Mini kit from Qiagen (Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's recommendations. RNA concentrations were determined by optical density at 260 nm, and RNA samples were stored at –80 °C until analysis. cDNA was prepared from 2 μ g purified RNA (First Strand cDNA Synthesis kit, Amersham Biosciences, Saclay, France) and 10-fold diluted before use. cDNA were amplified with a Taq polymerase and specific primers for human β -actin, FasL, HLA-G, IDO, PDL-1 and TGF- β 1-3 (MWG Biotech, Ebersberg, Germany) (Table 1). PCR was performed with a thermal cycler (RoboCycler Gradient 40, Stratagene, Amsterdam, Netherlands). After amplification, 25 μ l from each PCR product was electrophoresed on 2% agarose gel, and an amplified band was detected by ethidium bromide staining. The 100 bp DNA ladder was used as molecular weight marker (Invitrogen, Cergy Pontoise, France).

Table 1
Primers used in the RT-PCR experiments.

Target gene	Primer sequence	Expected size of the PCR-amplified fragment
β -actin	S: 5'-AGAGATGGCCACGGCTGCTT-3' AS: 5'-ATTTCGCGTGGACGATGGAG-3'	653 bp
FasL	S: 5'-GTGCCCAAGAGGCTGTGTCAGG-3' AS: 5'-TTGCAAGATTGACCCCGGAAGTAT-3'	503 bp
HLA-G	S: 5'-CGGAGTATTGGGAAGAGGAG-3' AS: 5'-TACAGCTGCAAGGACAACCA-3'	722 bp for HLA-G1 446 bp for HLA-G2 and -G4 170 bp for HLA-G3 844 bp for HLA-G5 568 bp for HLA-G6 662 bp
IDO	S: 5'-ACAGACCACAAGTACAGCG-3' AS: 5'-AACTGAGCAGCATCTCTCC-3'	
PDL-1	S: 5'-GACCTATATGTGGTAGAGTATGGTAGC-3' AS: 5'-TTCAGCTGTATGGTTTCTCAGGATC-3'	594 bp
TGF- β 1	S: 5'-GCGGTACCTGAACCCGTGT-3' AS: 5'-GTCAATGTACAGCTGCCGCAC-3'	477 bp
TGF- β 2	S: 5'-CCGGAGGTGATTTCACTTA-3' AS: 5'-CTCCATGTCTGAGACGCTCAA-3'	219 bp
TGF- β 3	S: 5'-CTCTCTGCTCACTTGACCA-3' AS: 5'-ACACATTGAAGCGGAAACC-3'	344 bp

S: sense primer; AS: anti-sense primer.

2.4. Quantitative reverse transcriptase (Q)-PCR

Total RNA extraction was performed as described above. cDNA was prepared from 0.5 µg purified RNA (High capacity cDNA reverse transcription kit, Applied Biosystems, Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) and 25-fold diluted before use. Real time-PCR was performed with a spectrofluorometric thermal cycler (7900 HT Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems) following the manufacturer's recommendations, except for the final PCR volume that was decreased to 12 µl. IDO and PDL-1 primers and probes were purchased from Applied Biosystems (TaqMan assays-on-demand). Each data point was run in triplicate. To normalize the data, GAPDH was chosen as an endogenous control and tested in separate wells. The comparative Ct method was used to determine relative gene copy numbers. Firstly, the ΔCt was taken as equal to Ct of the antigen of interest minus Ct of GAPDH. The relative copy number of each antigen was then determined using the formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, with $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (sample) – ΔCt (reference). The reference was a pool of RNA derived from three non-neoplastic brain samples. Samples with at least a 5-fold increase in mRNA expression compared to the reference were considered as positive.

2.5. Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed as described in Saikali et al. (2007). Briefly, GBM sections from 20 GBM specimens unrelated to specimens used to generate GBM primary cell lines were deparaffinised and rehydrated in PBS, and then incubated for 30 min at 20 °C with diluted primary antibodies against antigens (1/500, 1/50 and 1/100 dilutions for IDO, PDL-1 and vimentin, respectively). An additional incubation was performed with an anti-mouse or goat antibody (DakoCytomation) for 30 min. Sections were revealed using the peroxidase substrate kit (Vector Laboratories, Vandoeuve, France) and counterstained with hematoxylin. Microscopic analysis was performed using a Leitz-Diaphan microscope (Nuremberg, Germany). Results are expressed as the percentage of stained cells after counting 500 tumour cells in two different areas with the most intense expression, and represented as '–' for no expression, '–/+' for 1–25%; '+' for 26–50%; '++' for 51–75% and '++++' for 76–100% of analysed cells. GBM samples with less than 26% of positive cells are arbitrarily considered as negative.

2.6. Flow cytometry

Cells were washed in PBS 2% FCS and incubated with saturating concentrations of unlabelled or fluorescent-labelled primary antibodies for 30 min at 4 °C. An additional incubation with fluorescent-labelled secondary antibodies was performed when cells were stained with unlabelled primary antibodies. Cells were then washed with PBS 2% FCS and analysed by flow cytometry using a FACScan flow cytometer (BD Biosciences). For intracellular staining, cells were fixed with methanol and permeabilised with saponin. Data were then analysed with the CellQuest software (BD Biosciences). Results are expressed as specific fluorescence intensity given by the ratio of the geometric mean of test divided by the geometric mean of the isotype control.

2.7. TGF- β 2 secretion and IDO activity

Cells were washed in culture medium and incubated for 48 h at a concentration of 1×10^6 cells/ml in the presence or not of 1000 U/ml of IFN- γ (Boehringer Ingelheim, Paris). Supernatants were then centrifuged at 400 g for 5 min and frozen at –20 °C. IDO activity was evaluated by measuring tryptophan and kynurenine concentrations in culture supernatants by high performance liquid chromatography as described in Widner et al. (1997). TGF- β 2 secretion was

determined by ELISA following the manufacturer's instructions (R&D Systems, Lille, France). Active form of TGF- β 2 was analysed after acidification of supernatants with HCl according to the manufacturer's instructions.

2.8. Generation of Melan-A/HLA-A2-specific CTLs

HLA-A2 positive peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from healthy donors were prepared as described in Avril et al. (2009). Peripheral blood lymphocytes (PBL) and monocytes were separated by elutriation (J6-MC centrifuge, Beckman Coulter, Villepinte, France). Cells were then frozen in a 4% HSA (B Braun Medical SAS, Boulogne, France) 10% DMSO (LFB Biomedicaments, Courtaboeuf) solution. Melan-A/HLA-A2-specific CTLs were generated *in vitro* after repeated stimulations with autologous Melan-A peptide-pulsed dendritic cells.

To generate dendritic cells, monocytes were defrosted, washed and cultured for 6 days in RPMI 10% SVF supplemented with 1000 U/ml of rhGM-CSF (Novartis, Rueil-Malmaison, France) and 200 U/ml of rhIL-4 (AbCys, Paris) at 37 °C in a humidified 5% CO₂ incubator. Before use, dendritic cells were matured overnight with 1000 U/ml of rhTNF α (CellGenix, Clermont l'Herault, France) and 50 µg/ml of Poly IC (Sigma). Mature dendritic cells were then harvested, resuspended in RPMI at 2×10^6 cells/ml and incubated with 10 µg/ml of Melan-A peptide (sequence: ELAGIGITV, Genospheres Biotechnologies, Paris) for 1 h at 37 °C.

CD8+ T cell population was enriched from autologous PBL after depletion of CD4+ cells using a magnetic microbeads (Dynal, Invitrogen). Enriched CD8+ T cells (1×10^5 cells/well) were cocultured with Melan-A-pulsed dendritic cells (2×10^4 cells/well) in 200 µl of X-VIVO 15 medium (Lonza) supplemented with 5 ng per ml of rhIL-6 and rhIL-12 (Tébu-Bio, Le Perray-en-Yvelines, France) in a 96U-well microplate. Lymphocytes were then restimulated once every week with freshly prepared autologous peptide-pulsed dendritic cells (1×10^4 cells/well), 20 U/ml of rhIL-2 (Novartis) and 5 ng/ml of rhIL-7 (Tébu-Bio). After 3 stimulations, cells expanded in each well were separately tested in a IFN- γ release assay using Melan-A-pulsed HLA-A2+ T2 cells as targets. Cells from positive wells were pooled and expanded with additional stimulations using autologous peptide-pulsed dendritic cells. Melan-A/HLA-A2-specific CTLs generated were finally tested by flow cytometry for their expression of CD3 and CD8 T cell markers and their binding of Melan-A/HLA-A2 tetramer.

2.9. IFN- γ release assay

Irradiated target cells were washed and plated in RPMI 10% FCS at a concentration of 1×10^4 /well in a 96U-well microplate. Effector cells were washed and added onto the target cells at 5×10^4 cells/well. Blocking antibodies (10 µg/ml) and 1-methyltryptophan inhibitor (400 mM) were added 15 min before the effectors. Cells were then incubated for 24 h at 37 °C at the final volume of 200 µl/well. At the end of the assay, 150 µl of supernatant was centrifuged and analysed for IFN- γ by ELISA, following the manufacturer's instructions (Diaclone).

2.10. Cytotoxicity assay

5×10^6 target cells were labelled with 100 µCi of Na⁵¹CrO₄ (GE Healthcare, Orsay, France) for 90 min at 37 °C. Cells were washed twice in culture medium, resuspended in 1 ml of culture medium and incubated for 60 min at 37 °C to allow spontaneous release of ⁵¹-chromium. After 3 washes in culture medium, target cells were plated in X-VIVO medium at a concentration of 2×10^4 cells/well in a 96U-well microplate. Effector cells were washed in X-VIVO medium and added onto the target cells at different effector:target ratios as indicated in Fig. 5. Blocking antibodies (10 µg/ml) and 1-methyltryptophan inhibitor (400 mM) were added 15 min before the effectors and were

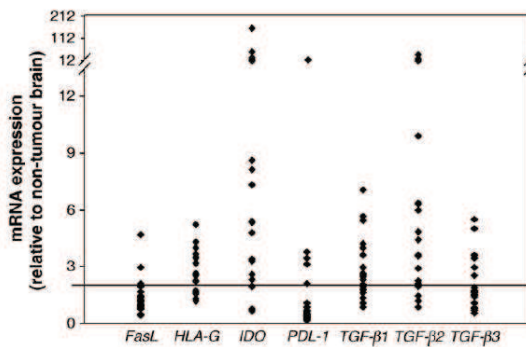


Fig. 1. FasL, HLA-G, IDO, PDL-1 and TGF- β 1–3 mRNA expression on 20 GBM samples by transcriptomic microarray analysis. Total mRNA from 20 GBM samples was extracted and analysed for a gene expression profile as described in de Tayrac et al. (2009). Results are expressed as the relative mRNA expression compared to a pool of non-neoplastic brain samples. Samples are considered as positive when relative mRNA expression shows more than a two-fold increase (solid line) compared to the reference.

present throughout the cytotoxicity assay. Cells were incubated for 4 or 24 h at 37 °C at the final volume of 200 μ l/well. Spontaneous and maximum releases were obtained by incubating target cells with the medium alone and with triton X-100, respectively. At the end of the assay, 50 μ l of supernatant were transferred into a scintillation microplate (Lumaplate 96, Perkin Elmer, Courtaboeuf), dried overnight at 54 °C and the radioactivity was measured with a gamma counter (TopCount, Packard Instruments, Meriden, United-States). The percent-

age of specific lysis was determined as follows: ((cpm of test release – cpm of spontaneous release)/(cpm of maximum release – cpm of spontaneous release)) * 100.

2.11. PHA-induced PBMC proliferation

1×10^5 PBMC were cocultured with irradiated 2×10^4 tumour cells in the presence of 1 μ g/ml of phytohemagglutinin (PHA) in a 96U-well microplate for 3 days at 37 °C in a humidified 5% CO₂ incubator. For IDO inhibition, 1-methyl-tryptophan inhibitor (400 mM) was added. ³H thymidine (1 mCi/well; GE Healthcare) was added 18 h before the end of the test. Cell incorporation of ³H thymidine was revealed by adding a scintillation fluid (Perkin Elmer) and measured with a gamma counter (Topcount).

2.12. Statistics

Values represent the mean \pm standard deviation of n different experiments. The Student *t*-test is applied using a two-tailed distribution of two conditions of unequal or equal variances on groups of data obtained in the experiments. The significance level is *p* < 0.05.

3. Results

3.1. FasL, HLA-G, IDO, PDL-1 and TGF- β 1–3 mRNA expression in a series of GBM samples by expression microarray analysis

We have recently reported a DNA target transcriptomic profiling on 20 GBM samples (de Tayrac et al., 2009). Using the complete microarray data set, FasL, HLA-G, IDO, PDL-1 and TGF- β 1–3 transcripts expression

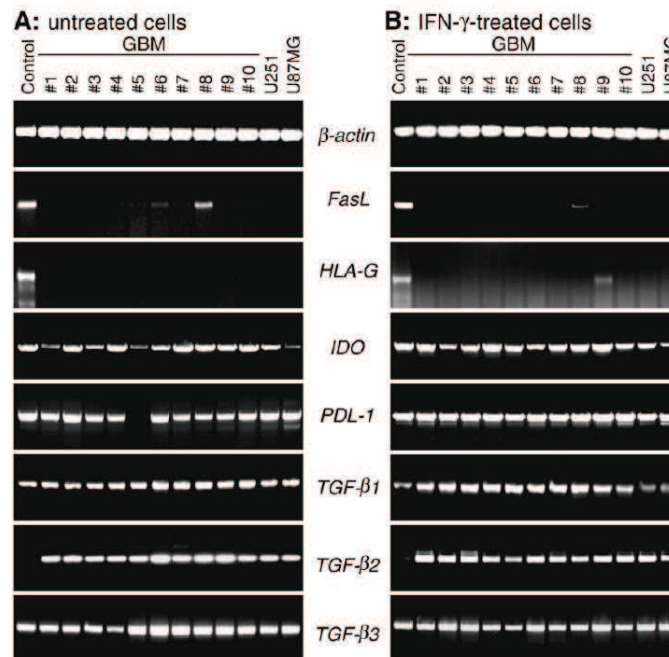


Fig. 2. FasL, HLA-G, IDO, PDL-1 and TGF- β 1–3 mRNA expression on GBM cell lines by RT-PCR. Total mRNA from untreated (A) or IFN- γ -treated (B) GBM primary cell lines, U251 and U87MG was extracted, reverse transcribed and then amplified with specific primers for β -actin, FasL, HLA-G, IDO, PDL-1 and TGF- β 1–3 molecules. Positive controls were used: JURKAT cell line for FasL and β -actin, JEG-3 cell line for HLA-G, IFN- γ -treated monocytes for IDO and PDL-1, and MCF-7 cell line for TGF- β 1–3. Amplified products were analysed by electrophoresis in 2% agarose gel and migrated at the position corresponding to their expected size.

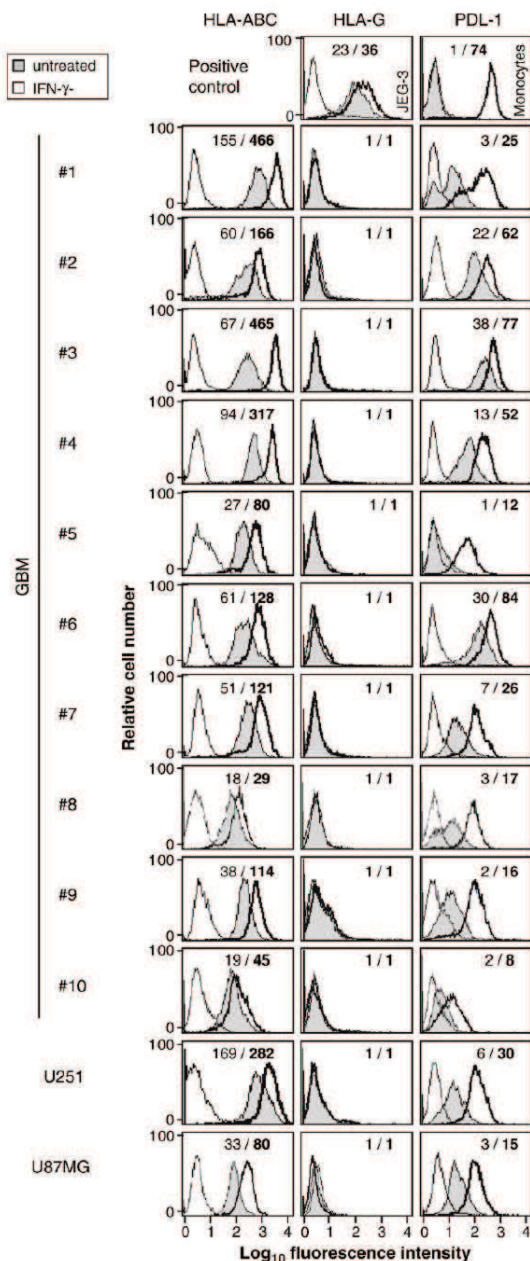


Fig. 3. HLA class I, HLA-G and PDL-1 protein expression on GBM cell lines. Untreated (shaded histograms) or IFN- γ -treated GBM cell lines, U251 and U87MG (open histograms with thick lines) were stained with isotype controls (open histograms with thin lines) or specific labelled antibodies against HLA class I, HLA-G and PDL-1 molecules, and then analysed by flow cytometry. JEG-3 cell line and IFN- γ -treated monocytes were used as positive controls for HLA-G and PDL-1 expression, respectively. Values in the top-right corners (in bold for IFN- γ -treated cells) indicate the mean of specific fluorescence intensity of the protein expression determined in at least three different experiments as described in Materials and methods section.

was compared between GBM and non-tumour brain samples. A significant increase (expression fold change greater than two) is observed in 15%, 60%, 85%, 30%, 70%, 80%, and 35% of GBM samples for FasL, HLA-G, IDO, PDL-1, TGF- β 1, TGF- β 2 and TGF- β 3, respectively (Fig. 1).

3.2. FasL, HLA-G, IDO, PDL-1 and TGF- β 1-3 mRNA expression in GBM cell lines

For *in vitro* assays, we have generated 10 GBM primary cell lines, and used U251 and U87MG cell lines. GBM cell lines as well as U251 and U87MG cell lines were characterised by their expression of vimentin, an intermediate filament highly expressed in GBM cells (Supplementary data, Fig. S1A), as well as by their lack of expression of a neural marker TujIII, and an oligodendrocytic marker O4 (data not shown). All GBM cell lines also expressed at least one of the tumour antigens IL13R α 2, EGFRvIII or gp100 that we previously reported on GBM (Saikali et al., 2007) (Supplementary data, Fig. S1B).

We then used RT-PCR to test mRNA expression of FasL, HLA-G, IDO, PDL-1 and TGF- β 1-3 in GBM cell lines. Only 2 out of 10 GBM primary cell lines express FasL with a weak expression level compared to the positive control (Fig. 2A). In addition, IFN- γ treatment was found to reduce the FasL mRNA expression of the positive cell lines. Consequently, this molecule was not studied further. HLA-G mRNA expression is not observed on GBM cell lines. Its expression is induced in only one out of 10 GBM cell lines after IFN- γ treatment (Fig. 2B). In contrast, most GBM primary cell lines express IDO, PDL-1 and TGF- β 1-3 mRNA at the resting state (Fig. 2A) or after IFN- γ stimulation (Fig. 2B).

3.3. HLA class I, HLA-G and PDL-1 protein expression in GBM cell lines

Protein expression of HLA-G and PDL-1 was screened by flow cytometry on both untreated and IFN- γ -treated GBM cell lines. As shown in Fig. 3, the expression of MHC class I molecules is increased after IFN- γ treatment, demonstrating the efficiency of this treatment. In addition, expression of PDL-1 and HLA-G is observed in the positive controls IFN- γ -treated monocytes and the JEG-3 trophoblastic cell line, respectively. However, none of the GBM cell lines express HLA-G even after IFN- γ stimulation. On the other hand, PDL-1 is expressed on most GBM cell lines (9 out of 10), while IFN- γ stimulation induces or increases the expression of this protein in all cell lines (Fig. 3).

3.4. IDO protein expression and activity in GBM cell lines

The IDO protein expression was analysed by immunohistochemistry. Only a low proportion of untreated GBM cell lines express IDO (around 25% on average), except GBM#4 (around 55%) (Fig. 4A, Table 2), while the IDO expression increases in all GBM cell lines

Table 2
IDO protein expression on GBM cell lines.

GBM cell lines	Untreated	IFN- γ -treated
GBM #1	+	+++
GBM #2	-/+	+++
GBM #3	+	+++
GBM #4	++	+++
GBM #5	+	+++
GBM #6	+	+++
GBM #7	-/+	+++
GBM #8	+	+++
GBM #9	-/+	+++
GBM #10	-/+	+++
U251	-/+	+++
U87MG	-/+	+++

Protein expression was analysed by immunohistochemistry on 10 GBM primary cell lines, U251 and U87MG after staining with specific antibodies against IDO. Results are expressed as percentage of positive tumour cells, as described in Materials and methods section. -: negative; -/+ : 1–25%; + : 26–50%; ++ : 51–75%; and +++ : 76–100% of analysed cells.

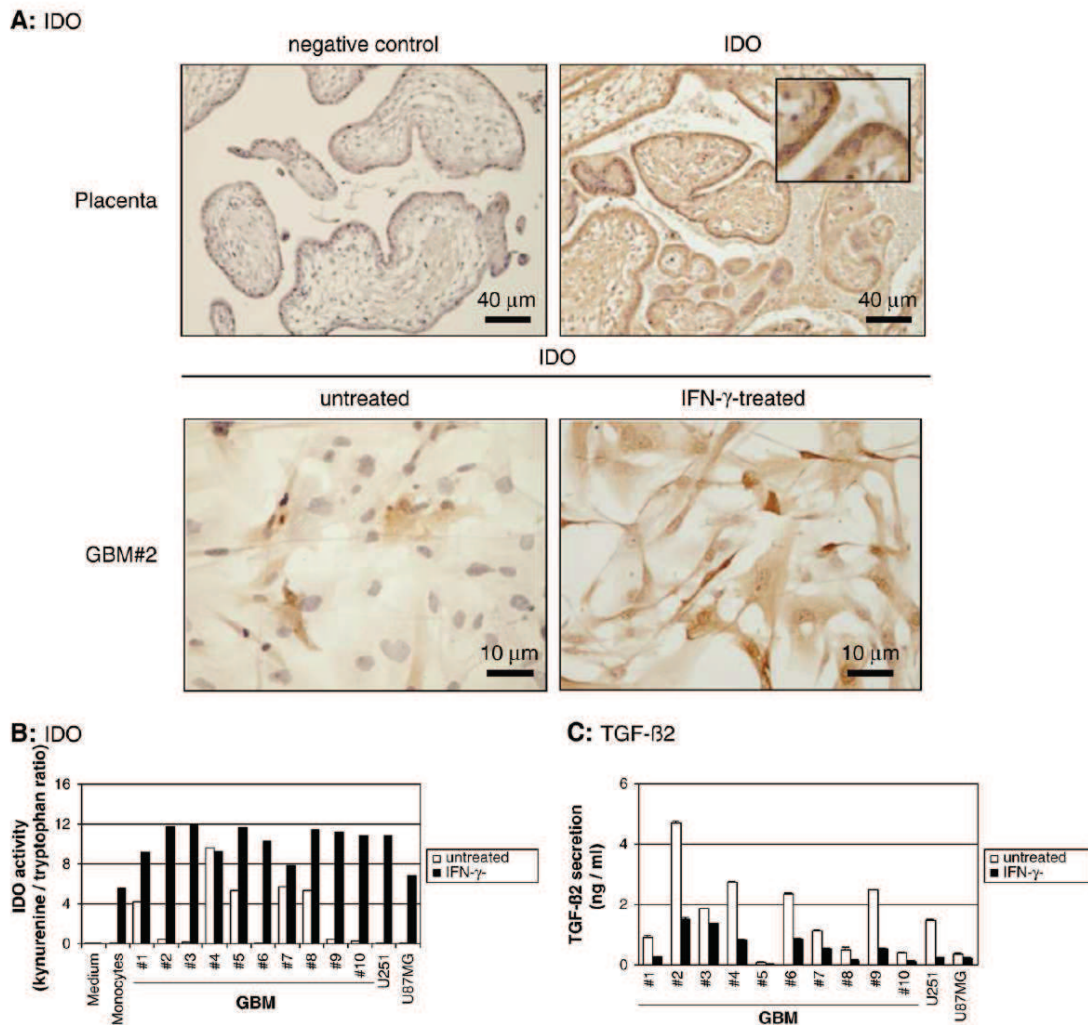


Fig. 4. IDO protein expression, IDO activity and TGF- β 2 secretion on GBM cell lines. (A): Untreated or IFN- γ -treated GBM cell lines were stained with specific anti-IDO antibodies and analysed by immunohistochemistry as described in Materials and methods section. Sections of human placenta, as positive controls, were stained with an isotype control and anti-IDO antibodies. A representative primary cell line GBM#2 is shown. (B and C): Untreated (□) or IFN- γ -treated (■) GBM cell lines, U251 and U87MG were cultured for 48 h in fresh medium. Supernatants were then collected and analysed for IDO activity (B) and TGF- β 2 secretion (C). Levels of tryptophan and kynurenine were assessed by HPLC and IDO activity was determined by the ratio kynurenine/tryptophan. Supernatants of untreated and IFN- γ -treated monocytes were used as controls (B). TGF- β 2 secretion was performed by ELISA after acidification of the supernatants (C). Results are representative of results obtained in three independent experiments.

treated by IFN- γ . Interestingly, the immunostaining intensity is lower on untreated cells compared with IFN- γ -treated cells (Fig. 4A).

The IDO activity in the supernatants of GBM cell lines was thereafter obtained by determining the level of tryptophan and kynurenine, this latter molecule being a degradation product of tryptophan. IDO activity is observed in half of the untreated GBM primary cell lines tested, being particularly high in GBM#4. IFN- γ stimulation induces or increases IDO activity in all the GBM cell lines (Fig. 4B).

3.5. TGF- β 2 secretion by GBM cell lines

TGF- β 2 secretion is observed at various levels in the supernatants of 9 out of 10 untreated GBM cell lines (Fig. 4C). Detection is observed

only after acidification of the supernatants, suggesting that the latent form of TGF- β 2 is mainly produced by GBM cell lines. Unexpectedly, IFN- γ treatment significantly reduces the secretion of TGF- β 2.

3.6. Melan-A/HLA-A2-specific T cell recognition of Melan-A-loaded GBM cell lines

To test the involvement of IDO, PDL1 and TGF- β 1–3 molecules in the sensibility of GBM cell lines to the effectors functions of T cells, we expanded antigen-specific T cell lines capable of recognizing GBM cell lines. Despite several attempts, we were unable to expand the IL13R α 2/HLA-A2-specific T cell lines as previously reported by Okano et al. (2002). We therefore generated Melan-A/HLA-A2-specific T cell

lines and tested them for Melan-A/HLA-A2 tetramer staining. As shown in Fig. 5A, 80% of cells from T cell line cultures are CD8⁺ T cells which bind to the Melan-A/HLA-A2 tetramer. In addition, T cells secrete IFN- γ when they are cultivated in the presence of Melan-A-loaded T2 cells, which are used here as positive controls (Fig. 5B). To test the recognition of GBM cell lines by these Melan-A/HLA-A2-specific T cell lines, GBM cells are unloaded or loaded with Melan-A peptides and cultivated with the T cell lines. Melan-A/HLA-A2-specific T cells are able to secrete IFN- γ when in the presence of Melan-A-loaded GBM primary

cells, but not in the presence of unloaded GBM cells. Interestingly, a drastic reduction in T cell IFN- γ secretion is observed when Melan-A/HLA-A2-specific T cells are cultivated in the presence of Melan-A-loaded GBM cells pre-treated by IFN- γ (Fig. 5B). T cell lines were then used as cytotoxic effectors against unloaded or Melan-A-loaded T2 cells and GBM primary cells. As shown in Fig. 5C, Melan-A/HLA-A2-specific T cells kill Melan-A-loaded T2 and GBM cells, but not unloaded cells. Again, T cell cytotoxicity is reduced against Melan-A-loaded GBM cells when they are pre-treated by IFN- γ .

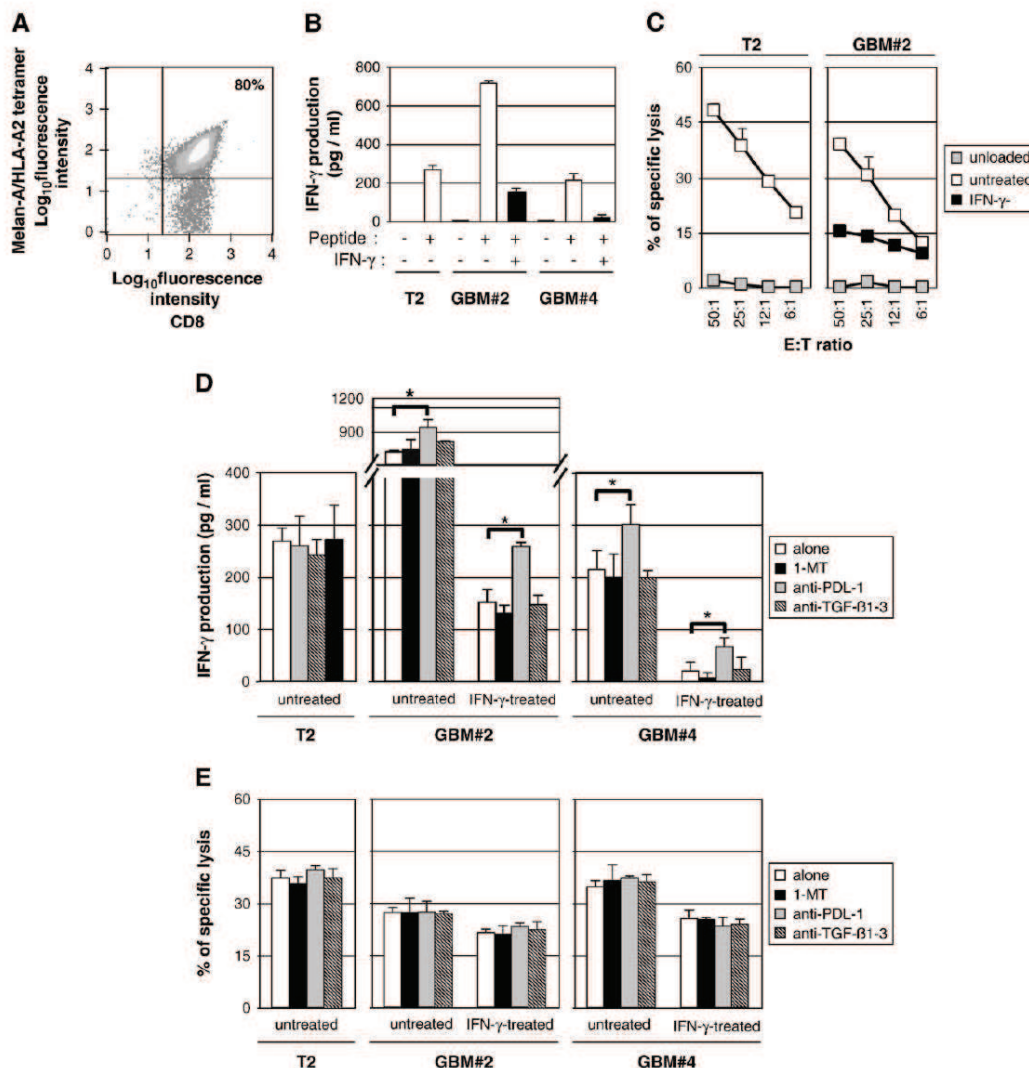


Fig. 5. Role of IDO, PDL-1 and TGF- β 1-3 on IFN- γ production and cell cytotoxicity of Melan-A/HLA-A2-specific T cells against Melan-A-loaded GBM cell lines. Melan-A/HLA-A2-specific T cell lines were generated *in vitro* after co-culture with autologous dendritic cells loaded with Melan-A peptides. (A): Melan-A/HLA-A2-specific T cell lines obtained were stained with Melan-A/HLA-A2 tetramers and anti-CD8 antibodies, and then analysed by flow cytometry. (B): Melan-A/HLA-A2-specific T cell lines were incubated with unloaded or Melan-A-loaded HLA-A2 expressing T2 cells (used as controls) and untreated (□) or IFN- γ -treated (■) GBM cell lines for 24 h. Supernatants were then collected and analysed for IFN- γ production by ELISA. (C): Melan-A/HLA-A2-specific T cell lines were used as effectors in a 4-hour cell cytotoxicity assay against ⁵¹Cr-labelled unloaded (□) or Melan-A-loaded (■) T2 cells, untreated (□) and IFN- γ -treated (■) GBM cell lines. Different effector:target (E:T) ratios were used and specific lysis was calculated as indicated in Materials and methods section. Melan-A/HLA-A2-specific T cell lines were used as effectors in a 24-hour IFN- γ production (D) and 4-hour cell cytotoxicity assays (E) in the presence or not (□) of blocking antibodies against PDL-1 (▨); TGF- β 1-3 (▨) or in the presence of 1-methyl-tryptophan (■), an IDO inhibitor. Melan-A-loaded T2, untreated and IFN- γ -treated GBM cell lines were used as target cells. Results are representative of results obtained with three different Melan-A/HLA-A2-specific T cell lines. (*) $p < 0.05$.

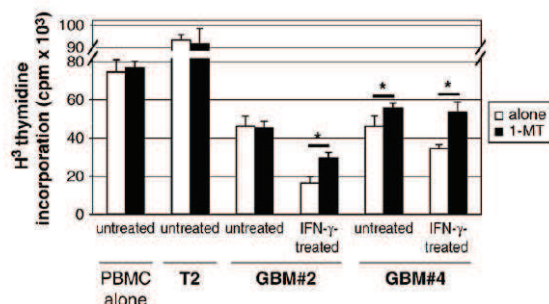


Fig. 6. Role of IDO on PHA-induced PBMC proliferation. PBMC were cultured for 3 days with PHA and irradiated T2 cells (used as a control), untreated or IFN- γ -treated GBM cell lines in the presence or not (□) of 1-methyl-tryptophan (■). ³H-thymidine was added 18 h before the end of the assay and cell incorporation of ³H-thymidine, corresponding to the PBMC proliferation, was determined as described in Materials and methods section. (*) $p < 0.05$.

3.7. Role of IDO, PDL-1 and TGF- β 1-3 on IFN- γ release and cell cytotoxicity of specific T cells

Melan-A/HLA-A2-specific T cells were used as effectors in IFN- γ secretion and cell cytotoxicity assays against GBM cells in the presence of blocking antibodies against PDL-1 or TGF- β 1-3 and in the presence of 1-methyl-tryptophan, an inhibitor of the IDO enzyme. These reagents have neither effect on IFN- γ secretion nor cell cytotoxicity functions of Melan-A/HLA-A2-specific T cells against T2 cells (Fig. 5D and E). By contrast, the presence of anti-PDL-1 antibodies increased the IFN- γ secretion of specific T cells in response to untreated or IFN- γ -pre-treated Melan-A-loaded GBM cells (Fig. 5D) demonstrating the involvement of PDL-1 in the inhibition of T cell IFN- γ secretion. On the other hand, the inhibitors of TGF- β 1-3 and IDO had no effect on IFN- γ secretion of specific T cells. None of the inhibitors tested have any effect as regards the cell cytotoxicity function, irrespective of whether the cytotoxicity assay lasted for 4 h or 24 h (Fig. 5E and data not shown). Supernatants of untreated and IFN- γ -treated GBM cell lines were also tested for their ability to inhibit IFN- γ secretion of Melan-A-specific T cells in response to Melan-A loaded T2 cells. Only a modest inhibition (around 25%) was observed with untreated GBM supernatants but not with IFN- γ -treated GBM supernatants (Supplementary data, Fig. S2). Furthermore, this inhibition was abolished by anti-TGF- β 1-3 antibodies (see Supplementary data, Fig. S2).

3.8. Role of IDO on PHA-induced PBMC proliferation

IDO has been previously reported as being involved in the inhibition of lymphocyte proliferation. We tested the lectin-induced PBMC proliferation with GBM primary cell lines in the presence of the IDO inhibitor, 1-methyl-tryptophan. As expected, lectin PHA induces the proliferation of PBMC, and the presence of allogeneic T2 cells enhances this effect (Fig. 6). In contrast, the PHA-induced proliferation of PBMC is reduced in the presence of GBM cells. Remarkably, this decrease is amplified when the GBM cells are pre-treated with IFN- γ (Fig. 6). The use of 1-methyl-tryptophan partially restores the inhibition of PBMC proliferation, suggesting a direct anti-proliferating role of IDO on PBMC.

3.9. IDO and PDL-1 mRNA and protein expressions in a series of 20 GBM samples

To confirm the presence of IDO and PDL-1 molecules *in vivo* within the tumour, 20 additional GBM samples were tested for mRNA expression of IDO and PDL-1 by Q-PCR and were immunohistochemi-

cally stained with anti-PDL-1 and IDO antibodies. mRNA expression was confirmed in 16 and 10 out of 20 GBM specimens for IDO (80%) and PDL-1 (50%) respectively (Fig. 7A). Immunohistochemical expressions of PDL-1 and IDO were first confirmed in positive controls i.e. urothelial carcinoma and placenta samples, respectively. All of 20 GBM samples express IDO but only 45% express PDL-1 (Fig. 7B, Table 3). A correlation between mRNA and protein expression was observed for PDL-1 but not for IDO (Fig. 7C).

4. Discussion

In this study, we analyse the expression of five immunoregulatory molecules FasL, HLA-G, PDL-1, IDO and TGF- β 1-3 in human GBM. Using GBM primary cell lines, we confirm the mRNA and protein expression of PDL-1, IDO and TGF- β 2 molecules in most of the GBM cell lines. Furthermore, functional studies highlight the role of PDL-1, TGF- β 1-3 and IDO in the inhibition of IFN- γ production by tumour-specific T cells and lectin-induced lymphocyte proliferation, respectively. None of these molecules are involved in the resistance of GBM to tumour-specific T cell cytotoxicity.

IFN- γ is a pleiotropic cytokine that is generally undetectable within the central nervous system. Nevertheless, in response to brain infections or brain disorders such as multiple sclerosis, IFN- γ is produced locally in large amounts by reactive T cells, but also activated astrocytes and microglial cells (Popko et al., 1997; Suzuki et al., 2004). Due to the inflammatory context induced by cancer, production of IFN- γ could be observed during tumoural processes in patients suffering from GBM. In addition, it has been shown that brain tumours and peritumoural regions express IFN- γ mRNA (Nitta et al., 1994). More recently, elevated IFN- γ serum concentrations have been reported in brain tumour patients compared to healthy donors (Mkhoyan et al., 2008). Considering these different points, we decided to investigate the immunoregulatory properties of resting or IFN- γ -treated GBM cells.

FasL and HLA-G expression has been previously reported in both GBM primary and immortalised cell lines as well as GBM specimens. FasL mRNA expression has been described by RT-PCR method in 6 out of 8 GBM immortalised cell lines and in 2 out of 6 primary tumours (Gratas et al., 1997). The southern-blotting approach markedly increased the detection of positive samples (Gratas et al., 1997). The FasL protein was also present in most of the GBM specimens analysed by western-blotting (4 out of 5) (Saas et al., 1997), and immunohistochemistry (overall 58 out of 59) (Gratas et al., 1997; Saas et al., 1997; Strege et al., 2004). However, the expression level observed by flow cytometry within GBM primary cell lines was always very low (Saas et al., 1997; Chaharvi et al., 2005). Using genomic microarray and conventional RT-PCR techniques, we only observe FasL mRNA expression in 3 out of 20 GBM specimens and in 2 out of 10 GBM primary cell lines. In addition, IFN- γ treatment diminishes significantly the FasL mRNA expression of the positive cell lines. For these reasons, the FasL molecule was not analysed further in our study.

HLA-G mRNA expression has been previously described within respectively 6 and 10 out 12 untreated and IFN- γ -treated glioma immortalised cell lines (Wiendl et al., 2002). In the present study, none of the untreated GBM primary or immortalised cell lines express HLA-G mRNA, while its expression is observed in only one of the IFN- γ -treated GBM primary cell lines tested. This discrepancy might be due to the sensitivity of the methods used i.e. conventional RT-PCR in our study as against northern-blotting in Wiendl et al. (2002). Differences in cell lines origin might also be incriminated: GBM primary cell lines versus glioma immortalised cell lines. In contrast to the lack of HLA-G mRNA expression in our GBM primary cell lines, 12 out of 20 GBM specimens tested expressed HLA-G mRNA according to our transcriptomic data. This could be due to the cell heterogeneity of the entire tumour used, which not only includes tumour cells, but also comprises a microenvironment compartment i.e. other locally

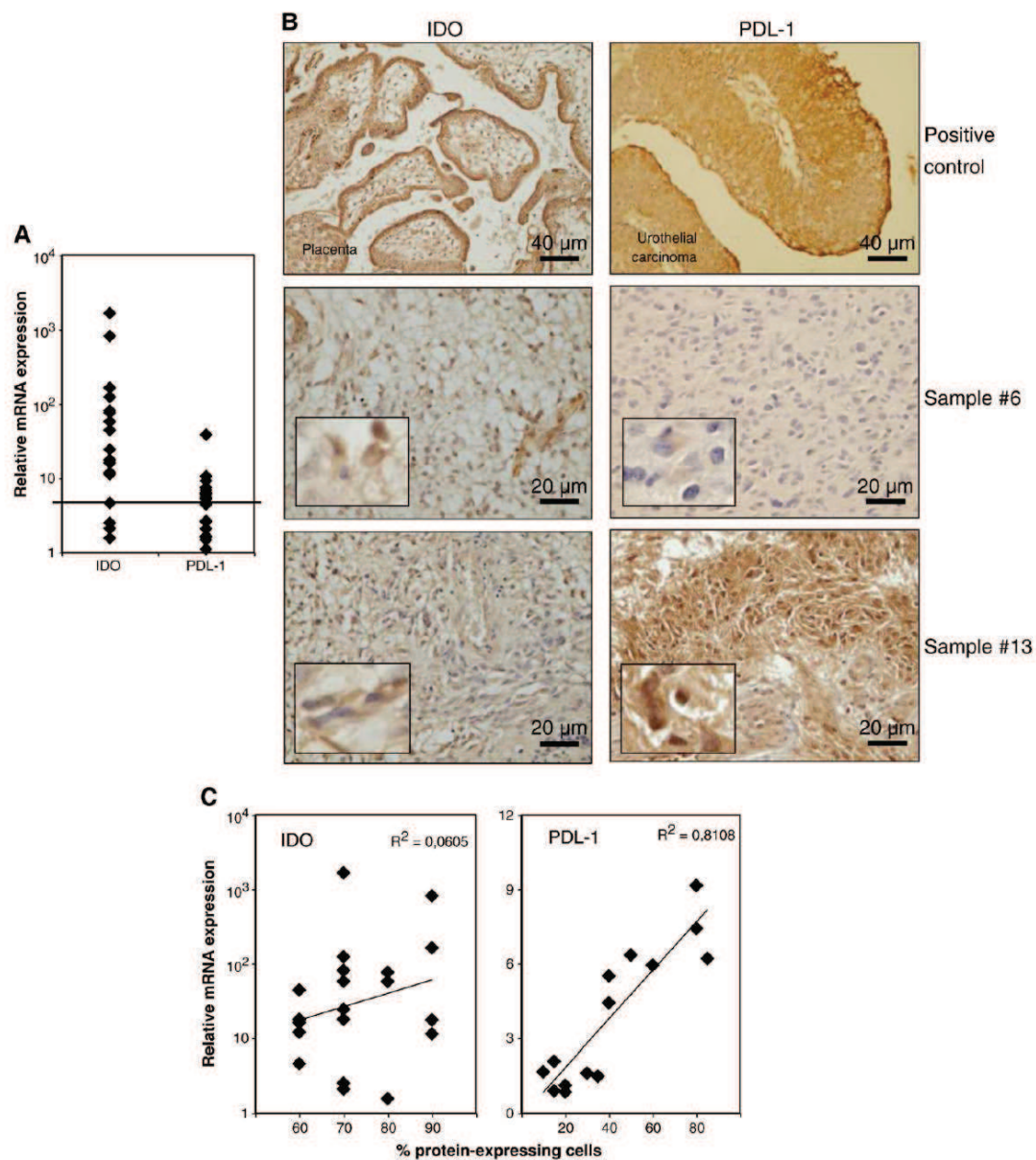


Fig. 7. IDO and PDL-1 mRNA and protein expression in a series of 20 GBM samples. (A): mRNA from a series of 20 GBM specimens was isolated and analysed by Q-PCR for IDO and PDL-1 mRNA expression. Results are expressed as the relative mRNA expression compared to a pool of non-neoplastic brain samples. The solid line indicates the 5-fold increase in mRNA expression compared to the reference. (B): GBM samples were stained with specific anti-IDO or anti-PDL-1 antibodies and analysed by immunohistochemistry. Placenta and urothelial carcinoma sections were used as positive controls for IDO and PDL-1, respectively. Two representative GBM specimens are shown. (C): the correlation curves between RNA expression and protein expression are calculated for IDO and PDL-1 molecules. R^2 indicates the correlation coefficient.

recruited or infiltrated cells. It is now well known that cells from different origins can express HLA-G molecules (Amiot et al., 1998). Thus, we cannot rule out the possibility that these non-tumour cells contribute alone to the HLA-G expression detected by our transcriptomic microarray analysis. Using flow cytometry, we fail to detect any

HLA-G protein expression on the cell surface of the GBM primary cell lines, as well as with U251 and U87 cells, even following treatment with IFN- γ . This is in agreement with the lack of HLA-G expression reported by a wide variety of solid tumours and especially in brain tumour specimens (Bainbridge et al., 2001; Davies et al., 2001).

Table 3
IDO and PDL-1 protein expression on GBM specimens.

GBM samples	IDO staining	PDL-1 staining
#1	+++	++
#2	+++	+++
#3	++	-/+
#4	+++	+
#5	+++	-/+
#6	++	-/+
#7	+++	-/+
#8	++	-/+
#9	+++	-/+
#10	+++	-/+
#11	+++	-/+
#12	+++	+++
#13	+++	+++
#14	+++	-/+
#15	+++	+
#16	++	-/+
#17	+++	+
#18	+++	+
#19	++	-/+
#20	+++	+

Protein expression was analysed by immunohistochemistry on 20 GBM samples after staining of the tumour sections with specific antibodies against IDO and PDL-1. GBM specimens are unrelated to specimens used to generate GBM primary cell lines. Results are expressed as percentage of positive tumour cells as described in Materials and methods section. –; negative; –/+; 1–25%; +; 26–50%; ++; 51–75%; and +++; 76–100% of analysed cells.

Therefore, HLA-G was not taken into consideration in further functional assays.

Increased production of TGF- β 1-3 occurs in various tumour types and correlates with tumour grade. (Bodmer et al., 1989; Leitlein et al., 2001; Pasche, 2001). TGF- β 2 has been considered to play a crucial role in both malignant progression of glial tumours and immune dysfunction in human GBM patients (Weller and Fontana, 1995). Transcript and protein expression of TGF- β 1-3 has long been known in malignant gliomas (Weller and Fontana, 1995). In glioma cell lines, TGF- β 1-3 were mainly documented in their small and large latent forms rather than their mature bioactive forms (Constam et al., 1992; Olofsson et al., 1992). In the present study, we show that all untreated and IFN- γ -treated GBM cell lines express TGF- β 2 transcripts. However, various levels of TGF- β 2 secretion are observed between untreated GBM cell lines. This suggests that expression of TGF- β 2 protein is finely regulated at the post-transcriptional level. Noticeably, the IFN- γ treatment decreases TGF- β 2 secretion in all the GBM cell lines analysed. In addition, TGF- β 2 from culture supernatants of GBM primary and immortalised cell lines can only be detected after acidification. This suggests that TGF- β 2 is mostly secreted in its latent form. TGF- β 1-3 has an important role in the regulation of anti-tumour immune responses, including the maturation of dendritic cells (Gorelik and Flavell, 2002) or the activation of T and NK cells (Thomas and Massagué, 2005; Eisele et al., 2006). TGF- β 1 acts directly on CD8 T cell cytotoxicity by inhibiting the expression of *FasL*, *perforin*, *granzymes A/B* and *IFN- γ* genes (Thomas and Massagué, 2005). In this study, using blocking antibodies against TGF- β 1-3, we fail to show any effect of TGF- β 1-3 in regulating T cell cytotoxicity against GBM primary cell lines. One plausible reason is that the latent or complex form of TGF- β 2, the predominant isoform of TGF- β secreted by GBM cells (Leitlein et al., 2001), might not be cleaved during the 4-hour cytotoxicity assay, thus preventing its action on T cells. Indeed, the TGF- β 1 effects on T cell cytotoxicity previously described in Thomas and Massagué (2005) can be obtained by pre-treating T cells typically for 24 h before the cytotoxicity assay. Alternatively, in contrast to TGF- β 1, TGF- β 2 might have no direct effect on T cell cytotoxicity. Using Melan-A-loaded GBM cells as target cells, no inhibitory effect of TGF- β 1-3 is observed on IFN- γ secretion of Melan-A-specific T cells. In contrast, supernatants of untreated GBM primary cell lines partially

inhibit the IFN- γ secretion of specific T cells in response to Melan-A-loaded T2 target cells (see Supplementary data, Fig. S2); and this inhibition is completely reversed by anti-TGF- β 1-3 blocking antibodies. This suggests that at least a fraction of TGF- β 1-3 is functional in this model and can inhibit T cell IFN- γ production. This discrepancy in the effect of TGF- β 1-3 on T cell IFN- γ secretion might be due to the difference of concentration of TGF- β 1-3 present in the two different models tested: the GBM cell concentration was 20 fold higher in experiments with supernatants. The mechanisms that regulate the activation of TGF- β 1-3 are complex and not well fully understood. Small and large latent forms of TGF- β 1-3 are converted to active forms of TGF- β 1-3 by proteases such as metalloproteases of the extracellular matrix. Latent forms could also directly interact with cell surface receptors that change their conformation and release the activated TGF- β 1-3 in an autocrine or a paracrine manner (Taylor, 2009). One could speculate that this phenomena is occurring in our IFN- γ secretion model.

In this work, we confirm the expression of IDO and PDL-1 in both GBM primary cell lines and tumour specimens at the mRNA and protein levels. PDL-1 expression was previously described in 12 untreated and IFN- γ -treated glioma immortalised cell lines (Winterle et al., 2003); 6 out of 7 GBM primary cell lines (Wilmotte et al., 2005) and in all of the 28 GBM specimens analysed (Winterle et al., 2003; Wilmotte et al., 2005). In this work, all untreated (except one) and IFN- γ -treated GBM cell lines express PDL-1 transcripts. However, variable protein expression levels are shown in the different untreated GBM cell lines. In addition, a correlation is observed in GBM specimens between mRNA level evaluated by Q-PCR and protein expression studied by immunohistochemistry. More than substantiating PDL-1 expression in about half of the GBM specimens, with various proportions of positive tumour cells, this work highlights the functional role of PDL-1. This is the first study demonstrating that PDL-1 reduces IFN- γ production by T cells, in a tumour antigen-specific T cell model. This is in accordance with previous results obtained using allogeneic CD4 and CD8 T cells (Winterle et al., 2003) and superantigen-reactive T cells (Wilmotte et al., 2005).

Expression of the enzyme IDO has previously been shown in glioma immortalised cell lines (Grant and Kapoor, 2003; Miyazaki et al., 2009) and GBM specimens (Uytendhove et al., 2003). We confirm mRNA and protein expression in both GBM primary cell lines and tumour specimens. As shown with other cell types in previous studies (Munn and Mellor, 2007; Corm et al., 2009); differences between IDO mRNA, protein expression and IDO activity are observed in most of GBM cell lines. Using GBM specimens, a lack of correlation is also observed between mRNA expression detected by Q-PCR and protein expression detected by immunohistochemistry. This could be due to the heterogeneity of the tumour samples, but could also reflect the complex regulation of IDO gene, protein and enzymatic activity that is still not fully elucidated. In agreement with previous results obtained with immortalised GBM cell lines (Grant and Kapoor, 2003; Miyazaki et al., 2009), we show that all the GBM cell lines treated with IFN- γ exhibit an IDO activity. Interestingly, IDO activity is also observed without any treatment in half of the cell lines. Moreover, the present study originally highlights the IDO functional role in GBM. Indeed, the IDO activity of GBM cell lines directly inhibits the lectin-dependent proliferation of human lymphocytes. Similar results have recently been described with ovarian cancer cells using an anti-CD3/28-induced T cell proliferation assay (Qian et al., 2009).

Concerning the functional assays with tumour-specific T cells, we first decided to use IL13R α 2 as a molecular target for GBM cells because this antigen is frequently expressed in GBM samples (Saikali et al., 2007). Indeed, we observed IL13R α 2 expression in all except one GBM primary cell line. Unfortunately, despite several attempts, we were unable to expand unmodified or modified IL13R α 2-specific T cells as previously described in Okano et al. (2002) and Eguchi et al. (2006). Even though we could confirm the presence of a small fraction

(around 20%) of IL13R α 2-specific T cells at the third stimulation by tetramer staining, all of T cells died subsequently to additional stimulations (data not shown). Recently, Zhang et al. (2007) have reported the expression of MART-1/Melan-A antigen in glioma immortalised cell lines such as U251 and U87MG and pointed out that the fact that Melan-A-specific T cell clones could recognize and kill of these cells. In our laboratory, Melan-A-specific T cell lines were generated and tested for IFN- γ production and cytotoxic activity in response to HLA-A2-positive GBM primary and U251 cell lines. Surprisingly, IFN- γ production or cytotoxic responses occurred only when target cells were loaded with Melan-A peptides, suggesting that GBM cells do not efficiently present Melan-A peptides on their surface. This suggests that GBM does not express MART-1 antigen. Indeed, Zhang et al. (2007) have shown that only 4 out of 25 GBM specimens express Melan-A mRNA by quantitative PCR and microarray analyses. Furthermore, in our laboratory, we failed to observe the Melan-A expression in a series of 34 GBM samples by quantitative RT-PCR (data not shown).

Using Melan-A-loaded GBM cell lines as target cells, we show that Melan-A-specific T cell lines recognize these target cells and, in response, produce IFN- γ and thus kill the cells. However, the pre-treatment of GBM cells with IFN- γ reduces markedly the IFN- γ secretion and decreases the cytotoxicity activity of specific T cells, whereas it increases the expression of HLA class I molecules, which are the molecular targets for T cell recognition. We can speculate that novel immunoregulatory molecules might be induced by IFN- γ and thus inhibit T cell functions. We demonstrate that PDL-1 is, at least in part, involved in the inhibition of T cell IFN- γ production. However, none of the molecules PDL-1, IDO and TGF- β 1–3 have any direct role in inhibiting the T cell cytotoxic function. Identification of the molecules involved in this process is currently under investigation in our laboratory. *In vivo*, we should expect tumour resistance to T cell mediated responses to be finely regulated in GBM patients. On the one hand, tumour infiltrating T cells would locally produce IFN- γ that could directly act on tumour cells by over-expressing molecules such as HLA class I molecules, which would therefore increase the tumour recognition by other T cells. On the other hand, IFN- γ -exposed tumour cells would up-regulate molecules such as PDL-1 and IDO that inhibit T cell functions. As a result, tumour cells would adapt and reinforce their resistance to T cell responses.

Immunotherapy is a promising new approach to cure GBM patients (Yamanaka, 2008). It is noteworthy that patients treated with dendritic cell vaccinations have demonstrated intra-tumour infiltration of cytotoxic T cells (Yamanaka et al., 2003; Kikuchi et al., 2004; Yu et al., 2004). However, as we show here, we should not underestimate the immunosuppressive properties of the tumour, which involve molecules such as PDL-1, IDO and TGF- β 2. This suggests that the immunotherapy approach has to be multimodal and should combine activators of immune cell effectors and inhibitors that counteract the immunosuppressive activities of the tumour. Novel inhibitors of IDO, PDL-1 and TGF- β 2 have been recently developed and are currently investigated in phase I/II clinical trials. The novel IDO enzyme inhibitor 1-MT has recently been used in a phase I study in refractory solid malignancies (Soliman et al., 2009). Both the safety and efficiency of this treatment have been demonstrated, and future trials will combine 1-MT with other immunotherapies and chemotherapies in solid tumours. In addition, two antibodies CT-011 and MDX-1106 against PD-1, that block its interaction with the ligands PDL-1 and -2, have been recently developed and are currently used in phase II clinical trials in advanced hematological malignancies (Berger et al., 2008), as well as refractory or relapsed solid tumours of lung, kidney, colon skin and prostate (Brahmer et al., 2009). In summary, it is hoped that the development of such molecules will provide essential adjuvants that will improve the efficiency of GBM patients' treatment by immunotherapy involving T cell responses.

Acknowledgments

We thank persons and organizations which have contributed to this work: Stéphane Moiteaux for his excellent technical assistance; L. Amiot, V. Catros and A. Clavreul for their kind gifts of the JEG-3 trophoblastic cell line, U251 and U87MG cell lines, respectively; the Biogenouest® transcriptomic platform from Rennes for the microarray analysis; Alain Feutrel and Pascale Bellaud from the Biogenouest® histopathology platform (IFR 140, Université de Rennes 1) for the immunohistochemistry analysis on GBM specimens; Gwénaële Duval and Elodie Morilland for their help in RT-PCR experiments and HLA-G study, respectively; Michèle Marty for her help in Q-PCR experiments; Brigitte Collet for the Melan-A expression data of GBM specimens; the 'SMI-TC' unit of CHU Pontchaillou and Olivier Tribut for the evaluation of IDO activity. M.S.N. Carpenter post-edited the English style. Grant support: This work was supported by the "Ligue Contre le Cancer" Committee of Ile-et-Villaine and Maine-et-Loire, as well as the Institut National du Cancer (the 'From the core to the margin' glioma project), Région Bretagne (GIS Thérapie cellulaire, CPER 2000–2006), and the foundation "Aidez la recherche".

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.jneuroim.2010.04.003.

References

- Amiot, L., Onno, M., Drénou, B., Monvoisin, C., Fauchet, R., 1998. HLA-G class I gene expression in normal and malignant hematopoietic cells. *Hum. Immunol.* 59, 524–528.
- Avril, T., de Tayrac, M., Leberre, C., Quillien, V., 2009. Not all polyribonucleoside-polyribocytidylic acids (Poly I:C) are equivalent for inducing maturation of dendritic cells: implication for alpha-type-1 polarized DCs. *J. Immunother.* 32, 353–362.
- Bainbridge, D., Ellis, S., Le Bouteiller, P., Sargent, I., 2001. HLA-G remains a mystery. *Trends Immunol.* 22, 548–552.
- Berger, R., Rotem-Yehudar, R., Slama, G., Landes, S., Kneller, A., Leiba, M., Koren-Michowitz, M., Shimoni, A., Nagler, A., 2008. Phase I safety and pharmacokinetic study of CT-011, a humanized antibody interacting with PD-1, in patients with advanced hematologic malignancies. *Clin. Cancer Res.* 14, 3044–3051.
- Bodmer, S., Strommer, K., Frei, K., Siepl, C., de Tribolet, N., Heid, I., Fontana, A., 1989. Immunosuppression and transforming growth factor-beta in glioblastoma. Preferential production of transforming growth factor-beta 2. *J. Immunol.* 143, 3222–3229.
- Brahmer, R., Topalian, S.L., Powderly, J., Wollner, I., Picus, J., Drake, C.G., Stankevich, E., Korman, A., Pardoll, D., Lowy, I., 2009. Phase II experience with MDX-1106 (Ono-4538), an anti-PD-1 monoclonal antibody, in patients with selected refractory or relapsed malignancies. *J. Clin. Oncol. (Meeting Abstracts)* 27, 3018.
- Carosella, E.D., Favier, B., Rouas-Freiss, N., Moreau, P., Lemaoult, J., 2008. Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule. *Blood* 111, 4862–4870.
- Chahlav, A., Rayman, P., Richmond, A.L., Biswas, K., Zhang, R., Vogelbaum, M., Tannenbaum, C., Barnett, G., Finke, J.H., 2005. Glioblastomas induce T-lymphocyte death by two distinct pathways involving gangliosides and CD70. *Cancer Res.* 65, 5428–5438.
- Chang, C.C., Ferrone, S., 2003. HLA-G in melanoma: can the current controversies be solved? *Semin. Cancer Biol.* 13, 361–369.
- Constam, D.B., Philipp, J., Malipiero, U.V., ten Dijke, P., Schachner, M., Fontana, A., 1992. Differential expression of transforming growth factor-beta 1, -beta 2, and -beta 3 by glioblastoma cells, astrocytes, and microglia. *J. Immunol.* 148, 1404–1410.
- Corn, S., Berthon, C., Imbenotte, M., Biggio, V., Lhermitte, M., Dupont, C., Briche, I., Quesnel, B., 2009. Indoleamine 2,3-dioxygenase activity of acute myeloid leukemia cells can be measured from patients' sera by HPLC and is inducible by IFN-gamma. *Leukoc. Res.* 33, 490–494.
- Davies, B., Hiby, S., Gardner, L., Loke, Y.W., King, A., 2001. HLA-G expression by tumors. *Am. J. Reprod. Immunol.* 45, 103–107.
- Dong, H., Strome, S.E., Salomao, D.R., Tamura, H., Hirano, F., Flies, D.B., Roche, P.C., Lu, J., Zhu, G., Tamada, K., Lennon, V.A., Celis, E., Chen, L., 2002. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat. Med.* 8, 793–800.
- Eguchi, J., Hatano, M., Nishimura, F., Zhu, X., Dusak, J.E., Sato, H., Pollack, I.F., Storkus, W.J., Okada, H., 2006. Identification of interleukin-13 receptor alpha2 peptide analogues capable of inducing improved antitumor CTL responses. *Cancer Res.* 66, 5883–5891.
- Eisele, G., Wischhusen, J., Mittelbronn, M., Meyermann, R., Waldhauer, I., Steinle, A., Weller, M., Friese, M.A., 2006. TGF-beta and metalloproteinases differentially suppress NKG2D ligand surface expression on malignant glioma cells. *Brain* 129, 2416–2425.

- Freeman, G.J., Long, A.J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L.J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M.C., Horton, H.F., Fouser, L., Carter, L., Ling, V., Bowman, M.R., Carreno, B.M., Collins, M., Wood, C.R., Honjo, T., 2000. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J. Exp. Med.* 192, 1027–1034.
- Corelik, L., Flavell, R.A., 2002. Transforming growth factor-beta in T-cell biology. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 46–53.
- Grant, R., Kapoor, V., 2003. Inhibition of indoleamine 2, 3-dioxygenase activity in IFN-gamma stimulated astroglia cells decreases intracellular NAD levels. *Biochem. Pharmacol.* 66, 1033–1036.
- Gratas, C., Tohma, Y., Van Meir, E.G., Klein, M., Tenan, M., Ishii, N., Tachibana, O., Kleihues, P., Ohgaki, H., 1997. Fas ligand expression in glioblastoma cell lines and primary astrocytic brain tumors. *Brain Pathol.* 7, 863–869.
- Greenwald, R.J., Freeman, G.J., Sharpe, A.H., 2005. The B7 family revisited. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 515–548.
- Katz, J.B., Muller, A.J., Prendergast, G.C., 2008. Indoleamine 2, 3-dioxygenase in T-cell tolerance and tumoral immune escape. *Immunol. Rev.* 222, 206–221.
- Kikuchi, T., Akasaki, Y., Abe, T., Fukuda, T., Saotome, H., Ryan, J.L., Kufe, D.W., Ohno, T., 2004. Vaccination of glioma patients with fusions of dendritic and glioma cells and recombinant human interleukin 12. *J. Immunother.* 27, 452–459.
- Kovats, S., Main, E.K., Librach, C., Stubblebine, M., Fisher, S.J., DeMars, R., 1990. A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. *Science* 248, 220–223.
- Leitelin, J., Aulwurm, S., Waltereit, R., Naumann, U., Wagenknecht, B., Garten, W., Weller, M., Platten, M., 2001. Processing of immunosuppressive pro-TGF-beta 1, 2 by human glioblastoma cells involves cytoplasmic and secreted furin-like proteases. *J. Immunol.* 166, 7238–7243.
- Liau, L.M., Prins, R.M., Kiertscher, S.M., Odesa, S.K., Kremen, T.J., Giovannone, A.J., Lin, J.W., Chute, D.J., Mischel, P.S., Cloughesy, T.F., Roth, M.D., 2005. Dendritic cell vaccination in glioblastoma patients induces systemic and intracranial T-cell responses modulated by the local central nervous system tumor microenvironment. *Clin. Cancer Res.* 11, 5515–5525.
- Miyazaki, T., Moritake, K., Yamada, K., Hara, N., Osago, H., Shibata, T., Akiyama, Y., Tsuchiya, M., 2009. Indoleamine 2, 3-dioxygenase as a new target for malignant glioma therapy. *J. Neurosurg.* 111, 230–237.
- Mkhoyan, G.G., Ter-Pogossian, Z.R., Gasparyan, M.G., Dzhangatspanyan, N.G., Hovhannesian, G.G., 2008. Cytokine regulation of immune response in patients with a brain tumor or injury. *Neurochem. J.* 25, 318–319.
- Munn, D.H., Mellor, A.L., 2007. Indoleamine 2, 3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. *J. Clin. Invest.* 117, 1147–1154.
- Munn, D.H., Zhou, M., Attwood, J.T., Bondarev, I., Conway, S.J., Marshall, B., Brown, C., Mellor, A.L., 1998. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 281, 1191–1193.
- Munn, D.H., Shafrizadeh, E., Attwood, J.T., Bondarev, I., Pashine, A., Mellor, A.L., 1999. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J. Exp. Med.* 189, 1363–1372.
- Nagata, S., Golstein, P., 1995. The Fas death factor. *Science* 267, 1449–1456.
- Nitta, T., Ebato, M., Sato, K., Okumura, K., 1994. Expression of tumour necrosis factor- α , - β and interferon- γ genes within human neuroglial tumour cells and brain specimens. *Cytokine* 6, 171–180.
- Okano, F., Storkus, W.J., Chambers, W.H., Pollack, I.F., Okada, H., 2002. Identification of a novel HLA-A*0201-restricted, cytotoxic T lymphocyte epitope in a human glioma-associated antigen, interleukin 13 receptor α 2 chain. *Clin. Cancer Res.* 8, 2851–2855.
- Olofsson, A., Miyazono, K., Kanzaki, T., Colosetti, P., Engström, U., Heldin, C.H., 1992. Transforming growth factor-beta 1, -beta 2, and -beta 3 secreted by a human glioblastoma cell line. Identification of small and different forms of large latent complexes. *J. Biol. Chem.* 267, 19482–19488.
- Pasche, B., 2001. Role of transforming growth factor beta in cancer. *J. Cell Physiol.* 186, 153–168.
- Popko, B., Corbin, J.G., Baerwald, K.D., Dupree, J., Garcia, A.M., 1997. The effects of interferon-gamma on the central nervous system. *Mol. Neurobiol.* 14, 19–35.
- Qian, F., Vilella, J., Wallace, P.K., Mhawech-Fauceglia, P., Tario Jr, J.D., Andrews, C., Matsuzaki, J., Valmori, D., Ayyoub, M., Frederick, P.J., Beck, A., Liao, J., Cheney, R., Moysich, K., Lele, S., Shrikant, P., Old, L.J., Odunsi, K., 2009. Efficacy of levo-1-methyl tryptophan and dextro-1-methyl tryptophan in reversing indoleamine-2, 3-dioxygenase-mediated arrest of T-cell proliferation in human epithelial ovarian cancer. *Cancer Res.* 69, 5498–5504.
- Saas, P., Walker, P.R., Hahne, M., Quiquerez, A.L., Schnuriger, V., Perrin, G., French, L., Van Meir, E.G., de Tribolet, N., Tschopp, J., Dietrich, P.Y., 1997. Fas ligand expression by astrocytoma *in vivo*: maintaining immune privilege in the brain? *J. Clin. Invest.* 99, 1173–1178.
- Saikali, S., Avril, T., Collet, B., Hamlat, A., Bansard, J.Y., Drenou, B., Cuegan, Y., Quillien, V., 2007. Expression of nine tumour antigens in a series of human glioblastoma multiforme: interest of EGFRvIII, IL-13R α 2, gp100 and TRP-2 for immunotherapy. *J. Neurooncol.* 81, 139–148.
- Soliman, H.H., Antonia, S., Sullivan, D., Vanahanian, N., Link, C., Lee, H., 2009. Overcoming tumor antigen anergy in human malignancies using the novel indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) enzyme inhibitor, 1-methyl-D-tryptophan (1MT). *J. Clin. Oncol. (Meeting Abstracts)* 27, 3004.
- Strege, R.J., Godt, C., Stark, A.M., Hugo, H.H., Mehdorn, H.M., 2004. Protein expression of Fas, Fas ligand, Bcl-2 and TGF-beta2 and correlation with survival in initial and recurrent human gliomas. *J. Neurooncol.* 67, 29–39.
- Stupp, R., Hegi, M.E., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Taphoorn, M.J., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Allgeier, A., Fisher, B., Belanger, K., Hau, P., Brandes, A.A., Gijtenbeek, J., Marosi, C., Vecht, C.J., Mokhtari, K., Wesseling, P., Villa, S., Eisenhauer, E., Gorlia, T., Weller, M., Lacombe, D., Cairncross, J.G., Mirmanoff, R.O., European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumour and Radiation Oncology Groups, National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group, 2009. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* 10, 459–466.
- Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J.G., Eisenhauer, E., Mirmanoff, R.O., 2005. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 352, 987–996.
- Suzuki, Y., Claflin, J., Wang, X., Lengi, A., Kikuchi, T., 2004. Microglia and macrophages as innate producers of interferon-gamma in the brain following infection with *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 35, 83–90.
- Taylor, A.W., 2009. Review of the activation of TGF-beta in immunity. *J. Leukoc. Biol.* 85, 29–33.
- de Tayrac, M., Etcheverry, A., Aubry, M., Saikali, S., Hamlat, A., Quillien, V., Le Treut, A., Galibert, M.D., Mosser, J., 2009. Integrative genome-wide analysis reveals a robust genomic glioblastoma signature associated with copy number driving changes in gene expression. *Genes Chromosomes Cancer* 48, 55–68.
- Thomas, D.A., Massagué, J., 2005. TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell* 8, 369–380.
- Uytendaele, C., Pilote, L., Théate, I., Stroobant, V., Colau, D., Parmentier, N., Boon, T., Van den Eynde, B.J., 2003. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2, 3-dioxygenase. *Nat. Med.* 9, 1269–1274.
- Walker, P.R., Saas, P., Dietrich, P.Y., 1997. Role of Fas ligand (CD95L) in immune escape: the tumor cell strikes back. *J. Immunol.* 158, 4521–4524.
- Walker, P.R., Calzascia, T., Dietrich, P.Y., 2002. All in the head: obstacles for immune rejection of brain tumours. *Immunology* 107, 28–38.
- Weller, M., Fontana, A., 1995. The failure of current immunotherapy for malignant glioma. Tumor-derived TGF-beta, T-cell apoptosis, and the immune privilege of the brain. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 21, 128–151.
- Weller, M., Weinstock, C., Will, C., Wagenknecht, B., Dichgans, J., Lang, F., Gulbins, E., 1997. CD95-dependent T-cell killing by glioma cells expressing CD95 ligand: more on tumor immune escape, the CD95 counterattack, and the immune privilege of the brain. *Cell. Physiol. Biochem.* 7, 282–288.
- Widner, B., Werner, E.R., Schennach, H., Wachter, H., Fuchs, D., 1997. Simultaneous measurement of serum tryptophan and kynurenine by HPLC. *Clin. Chem.* 43, 2424–2426.
- Wiendl, H., Mitsdoerffer, M., Hofmeister, V., Wischhusen, J., Bornemann, A., Meyer-mann, R., Weiss, E.H., Melms, A., Weller, M., 2002. A functional role of HLA-G expression in human gliomas: an alternative strategy of immune escape. *J. Immunol.* 168, 4772–4780.
- Wilmotte, R., Burkhardt, K., Kindler, V., Belkouch, M.C., Dussex, G., Tribolet, N., Walker, P.R., Dietrich, P.Y., 2005. B7-homolog 1 expression by human glioma: a new mechanism of immune evasion. *Neuroreport* 16, 1081–1085.
- Winterle, S., Schreiner, B., Mitsdoerffer, M., Schneider, D., Chen, L., Meyermann, R., Weller, M., Wiendl, H., 2003. Expression of the B7-related molecule B7-H1 by glioma cells: a potential mechanism of immune paralysis. *Cancer Res.* 63, 7462–7467.
- Yamanaka, R., 2008. Cell- and peptide-based immunotherapeutic approaches for glioma. *Trends Mol. Med.* 14, 228–235.
- Yamanaka, R., Abe, T., Yajima, N., Tsuchiya, N., Homma, J., Kobayashi, T., Narita, M., Takahashi, M., Tanaka, R., 2003. Vaccination of recurrent glioma patients with tumour lysate-pulsed dendritic cells elicits immune responses: results of a clinical phase I/II trial. *Br. J. Cancer.* 89, 1172–1179.
- Yamanaka, R., Homma, J., Yajima, N., Tsuchiya, N., Sano, M., Kobayashi, T., Yoshida, S., Abe, T., Narita, M., Takahashi, M., Tanaka, R., 2005. Clinical evaluation of dendritic cell vaccination for patients with recurrent glioma: results of a clinical phase I/II trial. *Clin. Cancer Res.* 11, 4160–4167.
- Yu, J.S., Liu, G., Ying, H., Yong, W.H., Black, K.L., Wheeler, C.J., 2004. Vaccination with tumor lysate-pulsed dendritic cells elicits antigen-specific, cytotoxic T-cells in patients with malignant glioma. *Cancer Res.* 64, 4973–4979.
- Zhang, J.G., Eguchi, J., Kruse, C.A., Gomez, G.G., Fakhrai, H., Schroter, S., Ma, W., Hoa, N., Miney, B., Delgado, C., Wepsic, H.T., Okada, H., Jadus, M.R., 2007. Antigenic profiling of glioma cells to generate allogeneic vaccines or dendritic cell-based therapeutics. *Clin. Cancer Res.* 13, 566–575.

7.8. Article N°6

Vauléon et al. *BMC Medical Genomics* 2012, **5**:41
<http://www.biomedcentral.com/1755-8794/5/41>



RESEARCH ARTICLE

Open Access

Immune genes are associated with human glioblastoma pathology and patient survival

Elodie Vauléon^{1,2*}, Avril Tony^{2,3}, Abderrahmane Hamlat⁴, Amandine Etcheverry^{2,5,6}, Dan Cristian Chiforeanu⁷, Philippe Menei⁸, Jean Mosser^{2,5,6}, Véronique Quillien^{2,3} and Marc Aubry⁶

Abstract

Background: Glioblastoma (GBM) is the most common and lethal primary brain tumor in adults. Several recent transcriptomic studies in GBM have identified different signatures involving immune genes associated with GBM pathology, overall survival (OS) or response to treatment.

Methods: In order to clarify the immune signatures found in GBM, we performed a co-expression network analysis that grouped 791 immune-associated genes (IA genes) in large clusters using a combined dataset of 161 GBM specimens from published databases. We next studied IA genes associated with patient survival using 3 different statistical methods. We then developed a 6-IA gene risk predictor which stratified patients into two groups with statistically significantly different survivals. We validated this risk predictor on two other Affymetrix data series, on a local Agilent data series, and using RT-Q-PCR on a local series of GBM patients treated by standard chemo-radiation therapy.

Results: The co-expression network analysis of the immune genes disclosed 6 powerful modules identifying innate immune system and natural killer cells, myeloid cells and cytokine signatures. Two of these modules were significantly enriched in genes associated with OS. We also found 108 IA genes linked to the immune system significantly associated with OS in GBM patients. The 6-IA gene risk predictor successfully distinguished two groups of GBM patients with significantly different survival (OS low risk: 22.3 months versus high risk: 7.3 months; $p < 0.001$). Patients with significantly different OS could even be identified among those with known good prognosis (methylated MGMT promoter-bearing tumor) using Agilent (OS 25 versus 8.1 months; $p < 0.01$) and RT-PCR (OS 21.8 versus 13.9 months; $p < 0.05$) technologies. Interestingly, the 6-IA gene risk could also distinguish proneural GBM subtypes.

Conclusions: This study demonstrates the immune signatures found in previous GBM genomic analyses and suggests the involvement of immune cells in GBM biology. The robust 6-IA gene risk predictor should be helpful in establishing prognosis in GBM patients, in particular in those with a proneural GBM subtype, and even in the well-known good prognosis group of patients with methylated MGMT promoter-bearing tumors.

Keywords: Glioblastoma, Immune system, Survival

* Correspondence: e.vauléon@rennes.univancer.fr

¹Department of Medical Oncology, Eugène Marquis Cancer Institute, rue de la bataille Flandres Dunkerque, Rennes 35042, France

²CNRS UMR 6061 Genetic and Development, University of Rennes 1, Rennes, France

Full list of author information is available at the end of the article



© 2012 Vauléon et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Background

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common and aggressive primary brain tumor in adults. Despite recent advances in multimodal therapy, prognosis remains limited [1]. Conventional treatment, generally maximal safe surgical resection followed by combination radiation and chemotherapy with temozolomide, fails to prevent tumor recurrence.

Recently, molecular subtypes of brain tumors have been characterized by microarray gene expression profiles [2-6]. These subgroups have been associated with significant differences in tumor aggressiveness, progression, and/or prognosis [7]. Gene expression analysis has been reported as being more accurate than conventional histology [8,9]. Due to this greater accuracy, expression-based classifications offer an opportunity to improve molecular classification of gliomas [6,7] and clinical diagnosis of glioblastomas [2]. Such advances could be helpful in designing future therapeutic trials [4,10].

Many arguments have supported a link between the immune system and glioma pathogenesis. In several epidemiologic studies, glioma incidence is inversely associated with allergy history [11-13]. T-lymphocyte infiltration has been reported in certain glioma patients and an elevated number of intratumoral effector T cells has been recently correlated with a better survival in GBM patients [14].

Interestingly, several transcriptomic studies using microarray technologies have also reported an immune signature in gene expression profiling of glioma [8,10,15,16] and GBM [17-20]. A signature associated with myeloid/macrophagic cells has been reported in most of these studies [10,15,16,18,20], a finding consistent with the known macrophage/microglia infiltration in GBM [21-23]. More recently, transcriptomic studies in glioma have revealed different signatures involving immune genes associated with overall survival (OS) [8,10,15,19]. Gravendeel et al. reported an immune response signature associated with poor survival in glioma (Cluster 23 – the M function category) [8]. Murat et al. reported better outcome in patients with gene clusters characterizing features of innate immune response and macrophages (G24 cluster – 134 probes, among them probes for *CD11b* and *CD163* genes) [19]. In contrast, Irliev et al. found an immune module (M7 module) associated with short survival that includes 449 genes, among them T-cell markers (CD4, CD8) and myeloid markers (MHC class II, TLR1 and TLR2) [15]. An NK cell signature (G12 gene cluster including Fc gamma receptors and DAP-12) has previously been reported in one study with higher level expression in primary GBM with shorter survival compared to low grade astrocytomas and secondary GBM [10].

In order to clarify the possible role of immune cells in GBM pathology and OS, we have performed

a co-expression network analysis focusing on 791 genes linked to the immune system. Using a meta-analysis approach and independent validation cohorts, we identified an immune signature of GBM linked to innate immunity involving myeloid and NK cells as well as a 6-immune genes risk-model stratifying patients into two groups with significantly different OS.

Methods

Immune-associated (IA) genes

Immune-associated genes were defined as genes annotated with the 'immune system process' Gene Ontology (GO) biological process term (GO:0002376) by the AmiGO annotation tool (505 genes). Important immune-associated genes not annotated with GO:0002376 in GO, such as cytokines, cells markers and immunomodulation genes (286 genes), were added to this GO genes list. This IA genes list is composed of 791 genes (Figure 1) (Additional file 1: Table S1).

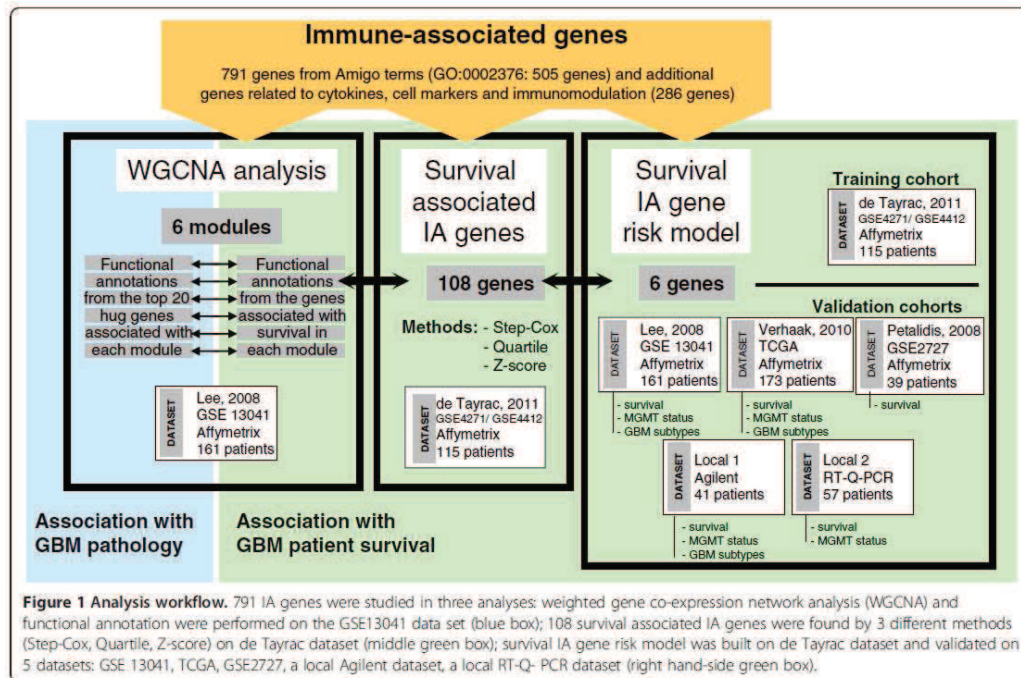
Patients and datasets

For the survival analysis we used four publicly available Affymetrix technology independent microarray datasets (Figure 1) [2,5,7,24]. Moreover, a local cohort including 41 patients with newly diagnosed grade IV glioma admitted to the neurosurgery department of Rennes and Angers University Hospitals was analyzed using a different technology (Agilent). Eventually, a local cohort of 57 newly diagnosed GBM patients, admitted to the neurosurgery department of Rennes University Hospital and homogeneously treated by surgery and radio-chemotherapy with temozolomide like Stupp's schedule, was analyzed by a reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction (Q-PCR). All patients of the local cohort signed their informed consent. All cohorts and patients characteristics are detailed in Table 1.

The MGMT status of the local cohort was obtained by pyrosequencing methylation assay with a threshold of CpG methylation set to $\geq 9\%$ [25,26]. Local tumor subtypes were determined using the centroid-based classification algorithm described by Verhaak et al. [7].

Weighted gene co-expression network analysis (WGCNA)

Signed weighted gene co-expression network analysis was performed on the GSE13041 data set [24] (Figure 1 and Table 1). A co-expression network was constructed on the basis of the IA genes. For all possible pairs of the variable genes, Pearson correlation coefficients were calculated across all samples. The correlations matrix was raised to the power 6, thus producing a weighted network. The weighted network was transformed into a network of topological overlap (TO) – an advanced co-expression measure that considers not only the correlation of 2 genes with each other, but also the extent of their shared correlations



across the weighted network. Genes were hierarchically clustered on the basis of their TO. Modules were identified on the dendrogram using the Dynamic Tree Cut algorithm [27]. Each gene's connectivity was determined within its module of residence by summing up the TOs of the gene with all the other genes in the module. By definition, highly connected (hub) genes display expression profiles highly characteristic for their module of residence [28]. To define a measure of prognostic significance, a univariate Cox proportional hazards regression model was used to regress patient survival on the individual gene expression profiles. The resulting p-values were used to define a measure of prognostic significance. To obtain a condensed representative profile of each module, focus was placed on the top 20 hub genes in the module. Co-expression network analyses were performed using the *WGCNA* R package. Survival analyses were performed using the *survival* R package.

WGCNA modules functional annotation and enrichment

Functional annotation of the IA genes co-expression modules was performed on the basis of the analysis of their top 20 hub genes and survival associated genes in each module. DAVID software (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) was used to test each module for genome enrichment in GO process terms, PIR superfamily, Panther or Kegg pathways, InterPro or SwissProt keywords, and to

test IA genes having an impact on overall survival (Fisher's exact tests with Benjamini-Hochberg correction for multiple testing).

IA genes associated with patient outcome

Molecular screening of IA genes was performed on 115 GBM patients included in a whole-genome Affymetrix meta-analysis dataset described by de Tayrac et al. [2]. Association between expression levels and patient outcome defined IA genes having an impact on overall survival (OS). Several survival analysis methods were used to identify relevant associations: (i) a Cox-step method [29], (ii) a differential analysis between the first and the fourth quartile, (iii) a classical Cox analysis (Figure 1). Adjusted p-values were calculated by controlling for the false discovery rate with the Benjamini-Hochberg correction. Overall survival was estimated by the Kaplan Meier method. Comparisons between survival groups were performed by the log-rank test. Univariate cox analyses were performed with gene expression data as a predictor and overall survival in months as the response.

IA genes risk model

An optimal survival model was built on IA genes associated with survival as described in de Tayrac et al. [2]. Analyses were performed using *survival*, *survivalROC* and

Table 1 Characteristic of patients and datasets

Name Dataset origin		de Tayrac GSE4271 GSE4412	Lee GSE13041	Verhaak TCGA Data Portal	Petalidis GSE2727	Local_1 CHU Rennes CHU Angers	Local_2 CHU Rennes
Technology		Affymetrix	Affymetrix	Affymetrix	Affymetrix	Agilent	Q-PCR
Number of samples		115	161	173	39	41	57
Gender	Male	M:65	M:96	M:112	M:29	M:21	M:31
	Female	F:50	F:65	F:61	F:10	F:20	F:26
Age (y)	median [min-max]	48 [18-82]	55 [22-86]	59 [14-87]	61 [22-74]	58 [33-80]	59 [36-78]
	<50	65	59	56	14	10	10
	>=50	50	102	117	25	31	47
KPS (%)	median	-	-	90 [40-100]	-	80 [40-100]	80 [40-100]
	<=70	-	-	22	-	15	28
	>70	-	-	58	-	23	29
	NA	-	-	-	-	3	-
Treatment (surgical)	biopsy	-	-	6	-	1	2
	partial resection	-	-	-	-	8	17
	total resection	-	161(a)	164	(c)	26	38
	NA	-	-	1	-	6	-
Treatment (adjuvant)	RT	-	-	-	-	3	-
	RT + CT like Stupp's schedule	-	(b)	(b)	(c)	37	57
	no treatment	-	-	-	-	1	-
MGMT status	Methylated	-	86	42	-	24	27
	Un-methylated	-	75	122	-	17	29
	NA	-	-	-	-	-	1
IDH1 status	Wild-type	-	-	167	-	39	39
	Mutated	-	-	6	-	2	1
	NA	-	-	-	-	-	17
Subtype	Proneural	-	41	48	-	12	-
	non-Proneural	-	120	125	-	29	-

(a) resection mentioned alone with no other details.

(b) Excessively heterogeneous treatment. GBM *de novo* tumors with no prior treatment.

(c) Data not available.

rbsurv R packages. These packages selected survival-associated genes and estimated the regression coefficients of the optimal survival model after adjustment on the study factor. All analyses were stratified on the age.

Q-PCR procedures

Total RNA was isolated using Rneasy Plus Mini QIAGEN kit from fresh-frozen glioblastoma samples. RNA integrity was confirmed using the Agilent Bioanalyser (RNA 6000 NANO assay kit). cDNA synthesis was obtained by a High capacity cDNA Reverse Transcription kit with Rnase inhibitor (Applied biosystem®). Q-PCR reactions were done with the 7900HT Fast Real-time PCR System using the Applied biosystem® Taq Man FAM-labeled probes for *ACVR2*, *CD22*, *MNX1*, *ARG1*, *RPS19* and *FGF2*, and the three housekeeping genes: *TBP*, *HPRT1*, *GAPDH*. Liver cells, testis cells, B lymphocytes and U251 cells were used as

positive control. The relative amounts of the gene transcripts were determined using the $\Delta\Delta Ct$ method, as described by the manufacturer.

Results

IA genes co-expression modules

WGCNA algorithm with the Lee dataset (GSE 13041) was applied to explore transcriptional relationships between IA genes and highlight consistent patterns of gene co-expression [24]. The weighted gene co-expression network constructed on the basis of the IA genes revealed 6 modules, each of them containing coordinately expressed genes potentially involved in shared cellular processes. To associate putative relevant processes and structures with the observed gene co-expression, we analyzed the functional enrichment of each module. For each module, the top five hub IA genes and the first five genes associated with

survival are provided in Figure 2. The modules' annotations were obtained with the top 20 hub IA genes associated with each module and all IA genes associated with survival

within this module (Figure 2). The IA genes co-expression modules were thus designated as followed: NK cells and innate immunity (blue module), Cytokines and molecular

Module assignment	Top 5 genes	p*	Annotation terms	ID*	p**	p***
NK cells & Innate Immunity	Genes associated with the module		Defense response	GO_0006952	8.80E-08	1.20E-05
	NCR1	2.86E-46	MHC class I NK cell receptor	PTHR_11736	3.40E-06	4.80E-05
	POLYRFP4	4.33E-44	Killer cell immunoglobulin-like receptor	PIRSF_018955	5.90E-05	6.50E-04
	IL1RAPL2	2.44E-41	Natural killer cell mediated cytotoxicity	KPTHW_04650	1.30E-04	2.60E-03
	KIR2DS1	2.96E-41				
	Genes associated with survival		Natural killer cell mediated immunity	PTHR_BP00157	1.00E-09	4.31E-08
	IFNA1	1.82E-03	Immunity and defense	PTHR_BP00148	6.14E-09	1.32E-07
	LCK	1.23E-02	Natural killer cell mediated cytotoxicity	KPTHW_04650	2.25E-08	4.73E-07
	CDK6	1.59E-02	MHC class I NK cell receptor	PTHR_11736	8.33E-07	6.67E-06
	KLRD1	1.73E-02				
	KIR3DL1	1.62E-03				
Cytokines & MHC class I	Genes associated with the module		Cytokine receptor activity	GO_0004896	1.90E-09	3.50E-08
	CSP2RA	1.56E-19	Cytokine binding	GO_0019955	7.20E-08	2.50E-06
	LILRB1	1.38E-14	Cytokine and chemokine mediated signaling pathway	PTHR_BP00107	2.40E-07	4.40E-06
	ICAM1	4.99E-14	Cell communication	PTHR_BP00274	2.10E-06	2.50E-05
	LILRA3	1.14E-13				
	TNFRSF10C	2.00E-13				
	Genes associated with survival		Antigen processing and presentation of peptide antigen	GO_0048002	1.90E-09	3.50E-08
	NOFR	3.43E-06	Class I histocompatibility antigen	PIRSF_001990	7.20E-08	2.50E-06
	HLA-G	6.77E-03	MHC class I-related, MHC class I antigen	PTHR_16675	2.40E-07	4.40E-06
	SBNO2	7.67E-03	MHC class I-like antigen recognition	IPR_011161	2.10E-06	2.50E-05
	HLA-C	7.89E-03				
	HLA-B	1.81E-02				
Myeloid cells	Genes associated with the module		White blood cells monocytes	CSQ_1570	1.20E-08	5.00E-07
	KYNU	3.09E-49	Leukocyte activation	GO_0045321	2.20E-07	2.70E-05
	LCP2	1.21E-46	Response to stimulus	GO_0050896	1.00E-06	1.30E-04
	PTGER4	5.30E-42	Macrophage-mediated immunity	PTHR_BP00155	3.90E-05	1.00E-03
	FCGR2A	2.02E-41				
	CLEC4A	1.26E-38				
	Genes associated with survival		Response to stimulus	GO_0050896	1.20E-08	5.00E-07
	LYN	5.26E-04	Inflammatory response	GO_0006954	2.20E-07	2.70E-05
	RPS19	9.45E-04	Myeloid leukocyte activation	GO_0002274	1.00E-06	1.30E-04
	XBP1	2.32E-03	White blood cells monocytes	CSQ_1564	3.90E-05	1.00E-03
	HIF1A	3.54E-03				
	ADAM9	3.62E-03				
Cell signalling & Lectin	Genes associated with the module		Cell surface receptor mediated signal transduction	PTHR_BP00103	1.30E-06	5.20E-06
	CD200	1.06E-10	Signal transduction	PTHR_BP00102	4.40E-06	8.90E-06
	BCL11A	2.12E-10	Heparin-binding growth factor/fibroblast growth factor	IPR_002348	1.70E-04	9.40E-03
	LILRB3	3.65E-10				
	ERBB4	1.21E-09				
	FGFR	1.30E-08				
	Genes associated with survival		Regulation of cellular process	GO_0050794	4.12E-05	1.85E-02
	CDCA2	7.65E-04	Carbohydrate binding	GO_0030246	4.52E-05	4.83E-03
	CD200	1.83E-03	Sugar binding	GO_0005529	7.08E-05	3.78E-03
	CLEC16A	3.05E-03	C-type lectin	IPR_001304	1.23E-04	7.86E-03
	MAG	7.49E-03				
	HIF1AN	8.61E-03				
Cell activation & apoptosis	Genes associated with the module		Leukocyte activation	GO_0045321	6.20E-10	1.70E-07
	UBE2N	2.08E-12	Response to stress	GO_0006950	2.60E-09	8.60E-08
	MALT1	2.75E-12	Regulation of apoptosis	GO_0042981	7.30E-06	3.00E-04
	MA3	8.61E-11	Positive regulation of cell proliferation	GO_0008284	2.20E-04	3.70E-03
	ADAM17	1.33E-10				
	CEBPG	1.78E-10				
	Genes associated with survival		Response to stimulus	GO_0050896	9.38E-04	ns
	CD164	9.47E-03	Leukocyte activation	GO_0045321	2.83E-03	ns
	CEBPG	1.36E-02	Cell activation	GO_0001775	3.96E-03	ns
	TMX1	2.24E-02	Response to stress	GO_0006950	1.41E-02	ns
	DPP4	2.40E-02				
	CNIH	4.02E-02				
Regulation of immune response	Genes associated with the module		Regulation of cell differentiation	GO_0045385	2.50E-09	8.50E-07
	CSF1	1.87E-15	Regulation of defense response	GO_0031347	1.60E-08	2.70E-06
	SBNO2	5.36E-17	Positive regulation of myeloid cell differentiation	GO_0045639	7.40E-08	8.10E-06
	GLT1M1	5.80E-12	Regulation of cell proliferation	GO_0042127	2.40E-06	1.60E-04
	NOTCH2	2.12E-11				
	BCU6	2.27E-11				
	No association with survival					

Figure 2 Gene annotations of the GBM co-expression modules. Annotations of the top 20 hub genes and survival associated genes in each module were tested for genome enrichment in Gene Ontology process terms (GO), PIR superfamily (PIRSF), Panther (PTHR) or KEGG (KPTHR) pathways, InterPro (IPR) keywords or CGAP Sage tissue expression data (CSQ) using the DAVID program (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>). *p* values were calculated for gene association to the module (*) and module annotations (** for *p* and *** Benjamini *p* values).

histocompatibility complex (MHC) class I (yellow module), Myeloid cells (turquoise module), Cell signaling and lectin (brown module), Cell activation and apoptosis (green module) and Regulation of immune response (red module).

IA genes associated with survival

Interestingly, two co-expression modules were significantly enriched in IA genes having an impact on overall survival: NK cells and innate immunity signature module and the Cytokines and MHC class I signature module ($p < 0.01$).

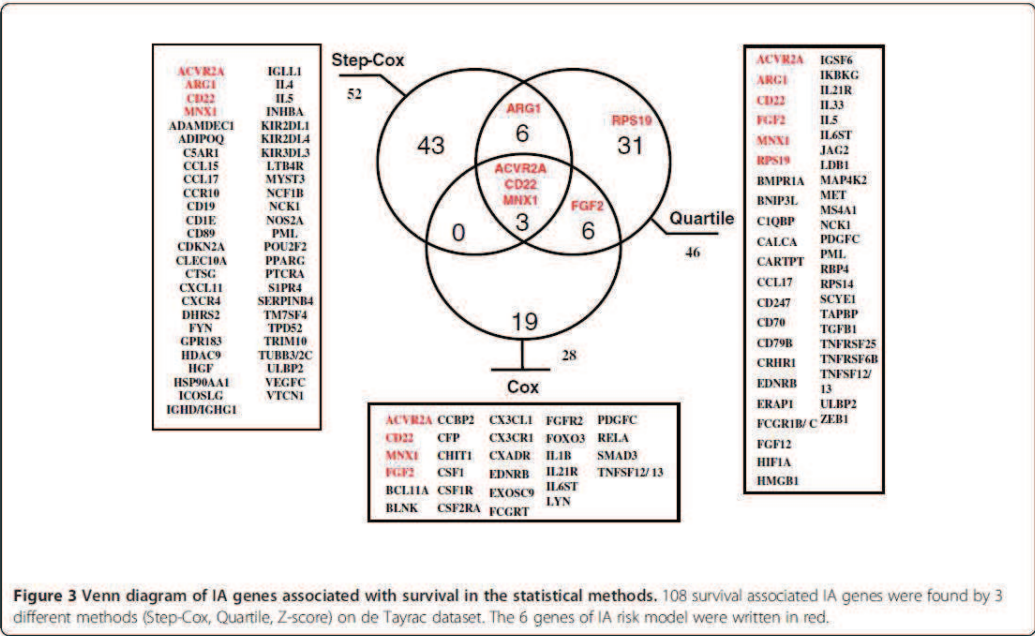
Three different methods were then applied to further analyze the IA genes associated with survival using the de Tayrac dataset. The step-Cox model identified 52 genes associated with overall survival. The quartile model found 46 genes significantly differentially expressed between the lowest survivors and the highest survivors. The classical Cox method identified 28 genes associated with patient outcome (Additional file 1: Table S2). The overlap between the three methods is presented in Figure 3. In conclusion, 108 out of 791 IA genes were found to be associated with GBM patient survival by at least one of the three different statistical methods.

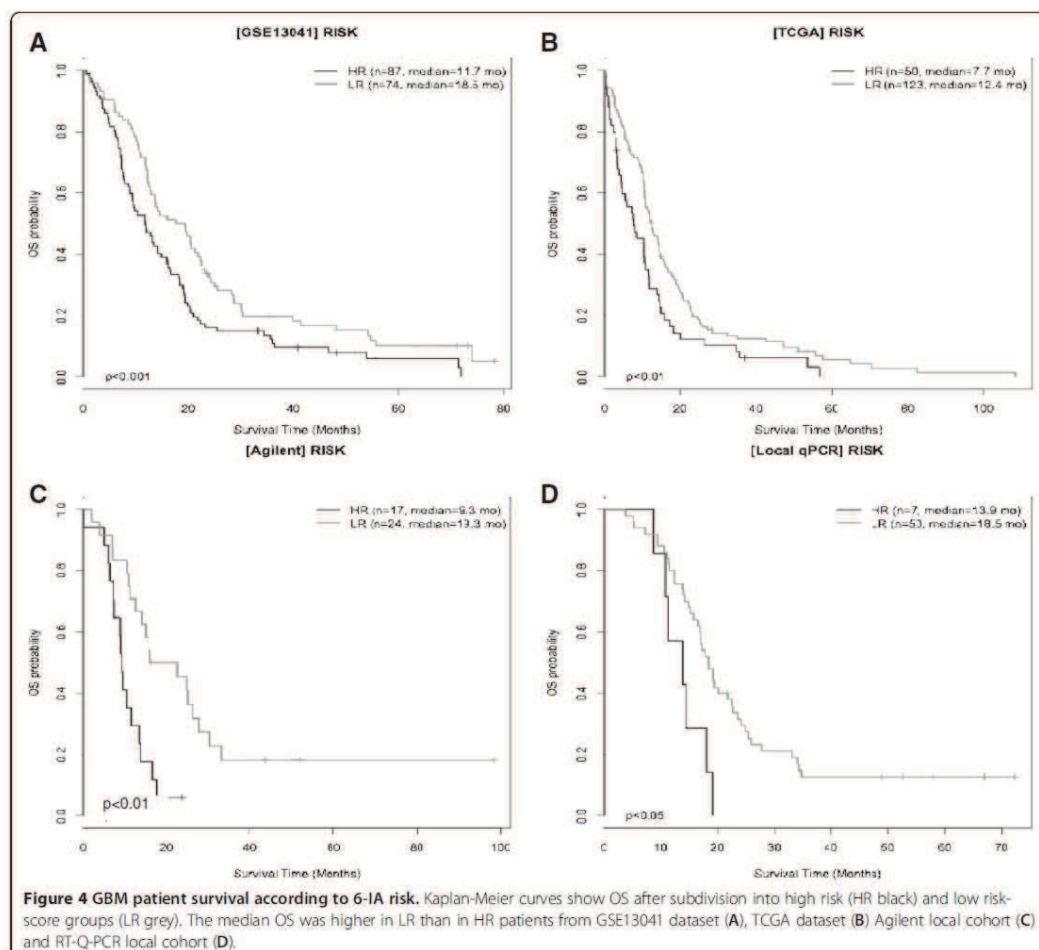
Risk-score model of IA genes as a GBM outcome predictor

An optimal survival model was built on IA genes associated with survival as described in de Tayrac et al. [2].

The mathematical model included 6 genes: ACVR2A, CD22, MNX1, ARG1, RPS19, FGF2 previously identified as described above. This risk-score equation based on the expression of these 6 genes can be written $(0.744 \times CD22) + (2.109 \times ACVR2A) + (0.860 \times MNX1) + (-1.328 \times RPS19) + (-1.028 \times FGF2) + (0.913 \times ARG1)$. A risk-score greater than or equal to the threshold of 0.30 signifies a high-risk patient with poor prognosis. Prognosis power is positive with expression of 4 genes (ACVR2A, CD22, MNX1, ARG1) and negative with expression of two others (RPS19, FGF2).

The risk-model (threshold = 0.30) stratified the training cohort (de Tayrac dataset) [2] into 2 groups with a significant difference in OS ($p = 4.0E-13$). The low-risk ($n = 66$) and high-risk ($n = 49$) groups had a median OS of 22.3 and 7.3 months, respectively. Stratification of the validation cohort (GSE 2727 published by Petalidis et al. [5]) led to a significant difference of OS (low risk group ($n = 18$): 12 months versus high risk group ($n = 21$): 6 months; $p = 1.2E-4$). The robustness of the 6-IA gene risk-score equation was also checked by using 2 external and publicly available studies performed on Affymetrix technologies (Table 1). The predictor identified two groups of patients with a significant difference in OS using the GSE13041 cohort [24] ($p < 0.001$) and the TCGA cohort [7] ($p < 0.01$). Median OS and number of patients in each risk category are provided in Figure 4.



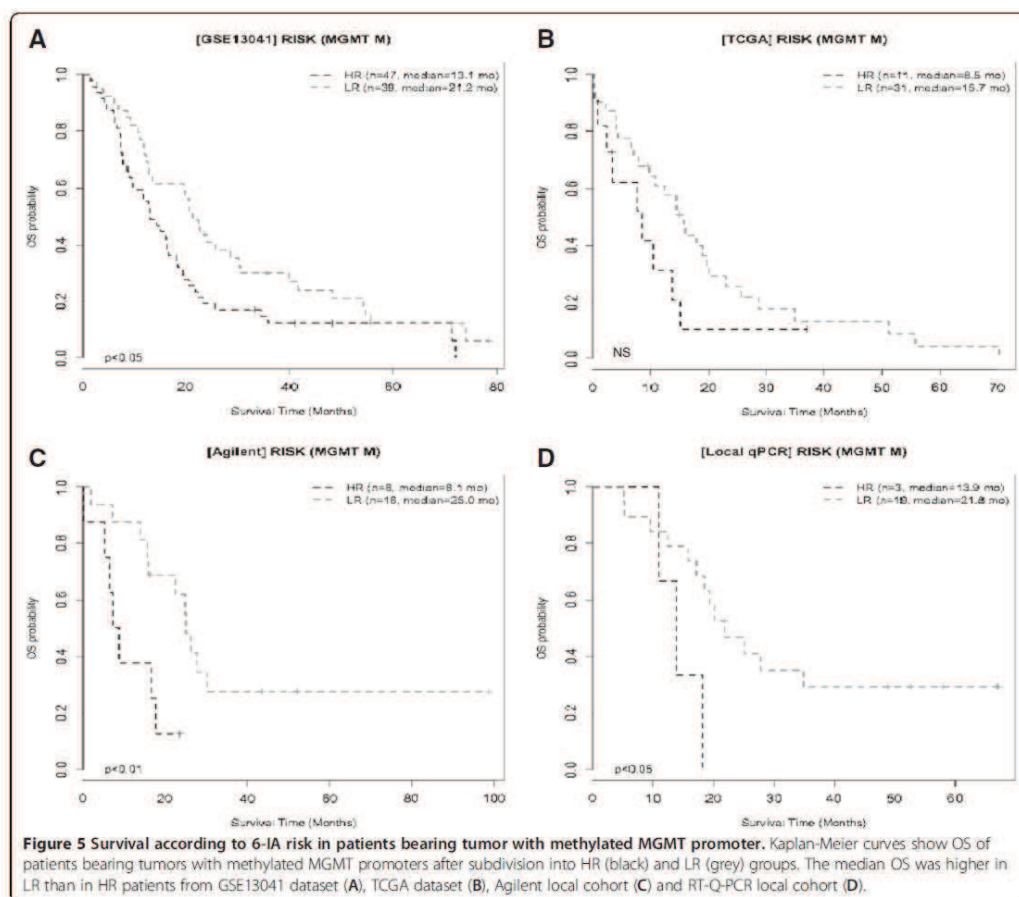


The performance of the 6-IA gene risk model was further tested on a local cohort of 41 patients using Agilent expression microarrays. Low-risk patients had a significantly better survival than high-risk patients (median OS of 19.3 months versus 9.3 months respectively; $p < 0.01$; Figure 4C). Eventually, reverse transcription Q-PCR based expression measurement of the 6-IA gene risk model genes was performed on a local cohort of 57 patients treated homogeneously. Low-risk patients had also a significantly better survival than high-risk patients (median OS of 18.5 months versus 13.9 months respectively; $p < 0.05$; Figure 4D).

IA genes risk-score model and MGMT methylation status

In univariate Cox analysis using the de Tayrac dataset, the only factors associated with survival were the

MGMT promoter methylation status and the 6-IA gene risk category. Sex, histology, age and KPS were not statistically associated with patient outcome. In multivariate analysis, the *MGMT* promoter methylation status and the 6-IA gene risk category were still significant ($p = 0.02$ and $p = 0.01$, respectively). Difference of survival defined by the 6-IA gene risk remained significant when considering patients bearing tumors with methylated *MGMT* promoters (25 versus 8.1 months, $n = 8$ and 16 respectively, $p < 0.01$; Figure 5C), as in the Lee dataset (21.2 versus 13.1 months, $p < 0.05$; Figure 5A). In the Q-PCR cohort, the *MGMT* status and the 6-IA gene risk category were also significantly associated with OS of GBM patients, in both univariate and multivariate analysis ($p = 0.045$ and $p = 0.036$, respectively). Nineteen patients with low risk had a median survival of 21.8 months



versus 13.9 months in three patients with high risk. Although the number of high-risk patients is low, the difference remains significant ($p < 0.05$; Figure 5D). No significant difference in survival could be found among patients bearing tumors with methylated MGMT promoters only in the TCGA cohort (Figure 5B). This might be explained by insufficient statistical power, especially since a significant difference was found in the 122 unmethylated MGMT promoter tumors from the TCGA cohort (data not shown).

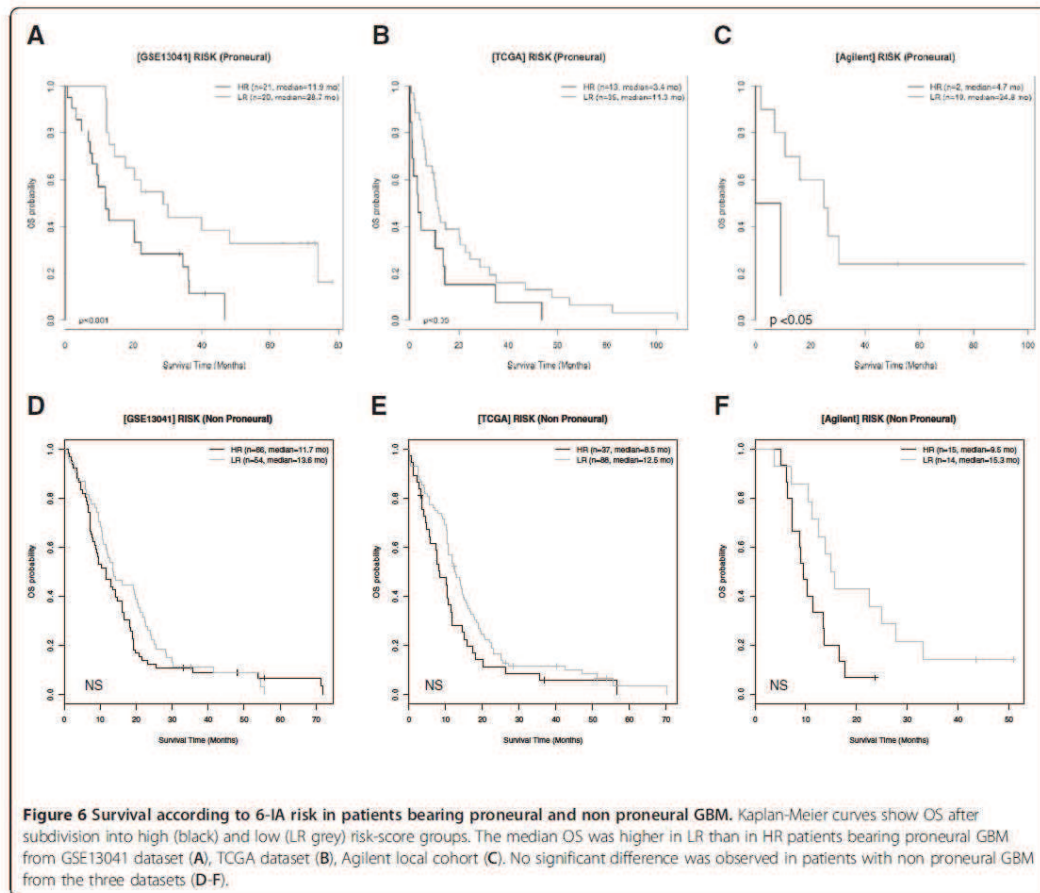
IA genes risk-score model and GBM subtypes

The 6-IA gene risk predictor was also applied to a local cohort and to the cohorts described by Lee and Verhaak [7,24] taking into account the recent GBM classification published by Phillips and Verhaak [6,7]. As only the proneural subtype is associated to survival [24], GBM

specimens were divided into two sub-groups: proneural (25% in GSE13041, 38% in TCGA, 29% in the local cohort) and non proneural (Table 1). The 6-IA gene risk predictor classed the patients with proneural GBM into two groups exhibiting significant OS difference: 11.9 versus 28.7 months ($p < 0.01$; [24]); 11.3 versus 3.4 months ($p < 0.05$, [7]); 24.8 versus 4.7 months ($p < 0.02$; in our local cohort) (Figure 6 A-C). Conversely, no difference was observed in the non proneural group of GBM (Figure 6 D-F).

Discussion

In this study, we were able to link IA genes expression pattern with GBM biology and patient survival. Indeed, our co-expression network analysis highlighted clusters of IA genes and revealed related immune signatures marking innate immunity, NK and myeloid cells and



cytokines/MHC class I molecules profiles. Furthermore, 108 IA genes were associated with OS. Among these, 6 IA genes were included in a weighted multigene risk model that can predict outcome in GBM patients.

Several studies have previously reported an immune signature in GBM [8,10,15-17,19,20,30]. A signature associated with myeloid/macrophagic cells was reported in most of these [10,15,16,18,20]. We also found such a signature linked to one co-expression module for which annotation enrichment found monocytes, leukocyte activation and macrophage-mediated immunity. The well known macrophage/microglia infiltration in GBM can account for up to one-third of cells in some GBM specimens [21-23]. Unlike Ivliev et al. [15], we were unable to identify a T-cell signature in our analysis. Nevertheless, the association of two gene modules with GBM patient survival suggests that innate immunity including NK cell

functions and cytokines/CMH class I profiles might affect outcome in GBM patients. A NK cell signature has previously been reported in one study in primary GBM [10]. NK cell infiltration was described earlier in glioma [31] but was not confirmed by others [32]. It is noteworthy that in murine glioma models, various vaccines strategies using CCL2 [33], CpG [34], IL12-expressing stroma cells [35] or IL23-expressing dendritic cells [36], induced an increased recruitment of NK cells at the tumor site, associated with better overall survival.

Most of chemokines present in the cytokines/MHC class I module are involved in recruiting T cells, monocytes/macrophages and neutrophils: e.g. *CX3CR1/CX3CL1*, *CXCL9* and *CXCR2* genes. In addition, most of the cytokines found such as *MIF*, *IL5*, *IL12A* and *IL16* genes are known to regulate macrophages/monocytes, eosinophils, NK and T cells. Lohr has also reported that intratumoral

infiltration of effector T cells is associated with a better survival in GBM [14]. In total, one could speculate that these two modules associated with overall survival reflect the recruitment and activation of immune cells such as NK cell, T cell, macrophages/monocytes, or neutrophils that would interfere with GBM patients' survival. Interestingly, several clinical trials using dendritic cells have reported that the presence of T cells and neutrophils at the tumor site is associated with longer survival of the vaccinated patients [37]. Recently, Ducray et al. reported that infiltration of both CD3+ T cells and CD68+ macrophages was observed more frequently in GBM responders than in non-responders to radiotherapy [17]. However, in the present study, we did not find any association between key regulators of the T cell biology such as *GATA3*, *TBX21* (*TBET*), and *RORC* (*ROR-gamma-t*) with patients' survival (data not shown). The small amount of these infiltrating cells is usually reported in the GBM specimens and might have impaired the identification of such genes by a transcriptomic approach.

In addition to the co-expression network analysis, we have found 108 IA genes directly associated with OS in GBM patient using three different statistical methods. These genes are known to be involved in the biology of B cells (i.e. *immunoglobulins*, *BLNK*, *CD19*, *CD20* and *CD22* genes), T cells (i.e. *CD1E*, *PTCRA*, *CD247*), NK cells (i.e. *KIR2DL1*, *KIR2DL4* and *KIR3DL3* genes), and myeloid cells including monocytes/macrophages (i.e. *ADAMDEC1*, *CD89/FCAR*, *CD64/FCGR1B* and *FCGR1C* genes) and neutrophils (i.e. *CD89*, and *NCF1B* genes). Surprisingly, other important genes expressed by glioma-infiltrating microglia/macrophages, such as *CD163* and *AIF1* (*IBA1*), were not significantly associated with patients' survival (data not shown). Komohara et al. have recently reported that the presence of CD163+ CD204+ M2-type macrophagic cells correlates with glioma grading and survival using an immunohistochemistry approach [38]. This discrepancy between our results and the Komohara et al. study could be explained by the fact that we used different technical approaches to detect these markers: at the mRNA level in our genomic study and at the protein level in [38]. Others genes of chemokines and cytokines have been also found such as *CCL15*, *CCL17*, *IL1B* and *IL5* genes. Finally, some genes are known to be involved in the modulation/suppression of the immune response such as *APRIL*, *ARG1*, *CD70*, *B7-H4*, *ICOSLG*, *NOS2A*, *TGFB1* and *TWEAK* genes.

Finally, we have developed a 6-IA-gene risk predictor of OS in GBM patients. The genes have been selected for an optimal survival model built on IA genes associated with survival as described in de Tayrac et al. [2]. This 6-IA gene risk is able to discriminate patients treated by chemo-radiation therapy into two distinct groups with significantly different survivals. These genes *ACVR2A*, *ARG1*, *CD22*, *FGF2*, *MNX1* and *RPS19*

were present in all but one of the co-expression modules. The 'regulation of immune response' module, which contains no gene retained in the 6-IA-gene risk predictor, is the only one that does not include survival-associated genes. *ACVR2A*, *CD22* and *MNX1* genes were found to be associated with GBM patient survival in the three different statistical methods. Intriguingly, these 6 IA genes are not specific markers for known immune cell subpopulations. They are involved in the activation or the inhibition of the immune system. As a result, they impact positively or negatively on the risk predictor. For example, the expression of *ARG1*, a gene involved in immunosuppression, contributes positively to the 6-IA-gene risk index and therefore decreases the patient's probability of survival. Although these genes are known in other cancers, they have not been described in GBM. *ACVR2A* is a receptor for activin-A and controls cell proliferation [39], for example proliferation of prostate cancer cells [40]. Mutations of *ACVR2A* are commonly found in unstable colonic cancers [41], and interestingly, infiltration of CD3 T cells is associated with mutated *ACVR2A* genes [42]. *ARG1* for arginase-1 is a cytosolic enzyme that hydrolyses arginine to urea and ornithine [43]. *ARG1* has recently been involved in immunosuppressive mechanisms by reducing T-cell activation [44]. *CD22* cannot be considered only to be a B cell receptor that mediates cell adhesion and signaling [45,46] since Mott et al. report that neurons can secrete this molecule [47]. Neuronal secretion of *CD22* inhibits microglia activation via interaction with *CD45* [47]. *FGF2* for fibroblast growth factor-2 stimulates GBM growth [48]. Nevertheless, the high molecular weight *FGF2* isoform inhibits glioma proliferation [49] and explains the radiation therapy resistance pathway [50]. Interestingly, plasma levels of FGF are higher in GBM patients compared to control [51]. *MNX1* gene is involved in a congenital malformation, the Currarino syndrome (congenital malformation) [52] and also previously reported in CD34+ cells, B cells and B lymphoid tissues [53]. *MNX1* function in immune cells and GBM biology has not been demonstrated yet but it has recently been described as a transcriptional factor implicated in the development of both solid and hematological cancers [54]. *RPS19* is a subunit of 40S ribosome involved in pre-rRNA processing but also has extra-ribosomal functions. Indeed, *RPS19* can act as a chemokine that regulates macrophage migration inhibitory factor (MIF) negatively [55]. Moreover, *RPS19* can interact with *FGF2* to drive differentiation or proliferation pathways of various cell types [56]. Only one statistical method, the quartile method, found this gene significantly (Figure 3), but the co-expression module found it to be significantly associated with OS (Figure 2).

To validate the strength of our 6-IA-gene risk predictor, expression of these genes was tested in a local cohort using RT Q-PCR. This technique has at least two advantages, it is used routinely in most laboratories and is relatively inexpensive compared with genomic microarray technologies. The test cohort was small (57 GBM specimens) but homogeneous in terms of treatment: combined surgery and chemo-radiation therapy [1]. In addition, the MGMT methylation status, which is the best predictor of response to the current combination treatment, was determined for all GBM specimens. Applied to this small cohort, 6-IA-gene risk predictor was even able to discriminate significantly between patients with high and low risk in the good prognosis group, defined by methylation of the MGMT promoter.

Recent advances in glioma classification have been achieved using genomic analysis. It is now accepted that GBM can be categorized in four subtypes defined as proneural, neural, mesenchymal, and classical groups [6,7,24]. The clinical outcome of the patients is different according to the GBM subtype. For instance, patients with proneural subtype live longer and the standard treatment does not increase their overall survival [6,7]. In contrast, overall survival of patients with classical or mesenchymal subtype is significantly increased with the standard treatment. Interestingly, we have shown that our 6-IA-gene risk predictor was powerful in GBM proneural subtype but not in others subtypes. GBM proneural is an atypical GBM subtype which is associated with younger age, *PDGFRA* gene amplification, *IDH1* mutations, *TP53* mutations [7]. Due to the fact that these patients with proneural GBM have longer survival, one could speculate that the anti-tumor immune response could have more time to occur and slow down the tumor progression in some of these patients with a particular immune profile, revealed by our 6-IA-gene risk predictor.

Conclusions

In conclusion, we have demonstrated that GBM are characterized by an immune signature which could reflect the infiltration and activation of immune cells or the immunosuppression mechanisms developed by the tumor itself. Several IA genes were found to be associated with clinical outcome of GBM patients, allowing us to describe a 6-IA-gene risk predictor. This risk model can discriminate between patients with different outcomes, even within the good prognosis group based on MGMT status and within the proneural GBM subtype group. Further studies are needed to understand how these IA genes are involved in the control of GBM progression. Overall, this study highlights the important role of the immune system in the battle against the

tumor and suggests new strategies for further development of immunotherapy for GBM patients.

Additional file

Additional file 1: Table S1. List of IA genes. **Table S2.** IA genes associated with survival in the 3 statistical methods.

Competing interests

No potential conflicts of interest were disclosed.

Authors' contributions

EV carried out the molecular studies, performed the statistical analysis, made the interpretation of the data and drafted the manuscript; TA participated in the design of the study, helped to draft the manuscript; and made the interpretation of the data; AH and PM provided GBM specimens and participated to the draft of manuscript; AE carried out the Agilent local microarray assays and helped to draft the manuscript; DCC reviewed the histopathology of GBM specimens; JM and VQ contributed to the conception and the design of the study and revised critically the manuscript; MA performed the statistical analysis, made the interpretation of the data, contributed to the conception and the design of the study and revised critically the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Grant support

This work was supported by Gefluc Rennes Bretagne (Groupement des Entreprises Françaises dans la Lutte contre le Cancer) et la Région Bretagne (CPER « Biothérapies »).

Acknowledgements

We thank Michèle Marty for her excellent technical assistance; and the medical staff of the Neurosurgery departments of the CHU Rennes and Angers for their contribution. G. Pope has post-edited the English style.

Author details

¹Department of Medical Oncology, Eugène Marquis Cancer Institute, rue de la bataille Flandres Dunkerque, Rennes 35042, France. ²CNRS UMR 6061 Genetic and Development, University of Rennes 1, Rennes, France. ³Department of Clinical Biology, Eugène Marquis Cancer Institute, Rennes, France. ⁴Department of Neurosurgery, University Hospital Rennes, Rennes, France. ⁵Medical Genomics Unit, Molecular Genetics and Genomics, University Hospital Rennes, Rennes, France. ⁶Biogenouest® Genomics Health Platform, University of Rennes 1, Rennes, France. ⁷Department of Pathology, University Hospital Rennes, Rennes, France. ⁸Department of Neurosurgery, University Hospital Angers, Angers, France.

Received: 2 February 2012 Accepted: 6 August 2012

Published: 14 September 2012

References

1. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, et al: **Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma.** *N Engl J Med* 2005, **352**:987-996.
2. De Tayrac M, Aubry M, Saikali S, Etcheverry A, Surbled C, Guenet F, Galibert MD, Hamlat A, Lesimple T, Quillien V, et al: **A 4-gene signature associated with clinical outcome in high-grade gliomas.** *Clin Cancer Res* 2011, **17**:317-327.
3. Freije WA, Castro-Vargas FE, Fang Z, Horvath S, Cloughesy T, Liaw LM, Mischel PS, Nelson SF: **Gene expression profiling of gliomas strongly predicts survival.** *Cancer Res* 2004, **64**:6503-6510.
4. Li A, Walling J, Ahn S, Kotliarov Y, Su Q, Quezada M, Oberholtzer JC, Park J, Zenklusen JC, Fine HA: **Unsupervised analysis of transcriptomic profiles reveals six glioma subtypes.** *Cancer Res* 2009, **69**:2091-2099.
5. Petalidis LP, Oulas A, Backlund M, Wayland MT, Liu L, Plant K, Happerfield L, Freeman TC, Poirazi P, Collins VP: **Improved grading and survival prediction of human astrocytic brain tumors by artificial neural network analysis of gene expression microarray data.** *Mol Cancer Ther* 2008, **7**:1013-1024.

6. Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, Misra A, Nigro JM, Colman H, Socorcescu L, et al: **Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis.** *Cancer Cell* 2006, **9**:157-173.
7. Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP, et al: **Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1.** *Cancer Cell* 2010, **17**:98-110.
8. Gravendeel LA, Kouwenhoven MC, Gevaert O, de Rooij JJ, Stubbs AP, Duijm JE, Daemen A, Bleeker FE, Bralten LB, Kloosterhof NK, et al: **Intrinsic gene expression profiles of gliomas are a better predictor of survival than histology.** *Cancer Res* 2009, **69**:9065-9072.
9. Nutt CL, Mani DR, Betensky RA, Tamayo P, Cairncross JG, Ladd C, Pohl U, Hartmann C, McLaughlin ME, Batchelor TT, et al: **Gene expression-based classification of malignant gliomas correlates better with survival than histological classification.** *Cancer Res* 2003, **63**:1602-1607.
10. Godard S, Getz G, Delorenzi M, Farmer P, Kobayashi H, Desbaillets I, Nozaki M, Diserens AC, Hamou MF, Dietrich PY, et al: **Classification of human astrocytic gliomas on the basis of gene expression: a correlated group of genes with angiogenic activity emerges as a strong predictor of subtypes.** *Cancer Res* 2003, **63**:6613-6625.
11. Lachance DH, Yang P, Johnson DR, Decker PA, Kollmeier TM, McCoy LS, Rice T, Xiao Y, Il-Osman F, Wang F, et al: **Associations of high-grade glioma with glioma risk alleles and histories of allergy and smoking.** *Am J Epidemiol* 2011, **174**:574-581.
12. Schlehofer B, Blettner M, Preston-Martin S, Niehoff D, Wahrendorf J, Arslan A, Ahlborn A, Choi WN, Giles GG, Howe GR, et al: **Role of medical history in brain tumour development. Results from the international adult brain tumour study.** *Int J Cancer* 1999, **82**:155-160.
13. Zhou M, Wiemels JL, Bracci PM, Wrensch MR, McCoy LS, Rice T, Sison JD, Patoka JS, Wiencke JK: **Circulating levels of the innate and humoral immune regulators CD14 and CD23 are associated with adult glioma.** *Cancer Res* 2010, **70**:7534-7542.
14. Lohr J, Ratliff T, Huppertz A, Ge Y, Dictus C, Ahmadi R, Grau S, Hiraoka N, Eckstein V, Ecker RC, et al: **Effector T-cell infiltration positively impacts survival of glioblastoma patients and is impaired by tumor-derived TGF-beta.** *Clin Cancer Res* 2011, **17**:4296-4308.
15. Mljev AE, Hoen PA, Sergeeva MG: **Coexpression network analysis identifies transcriptional modules related to astrocytic differentiation and sprouty signaling in glioma.** *Cancer Res* 2010, **70**:10060-10070.
16. Shirahata M, Iwano-Kozumi K, Saito S, Ueno N, Oda M, Hashimoto N, Takahashi JA, Kato K: **Gene expression-based molecular diagnostic system for malignant gliomas is superior to histological diagnosis.** *Clin Cancer Res* 2007, **13**:7341-7356.
17. Ducray F, De RA, Chinot O, Idbaih A, Figarella-Branger D, Colin C, Karayan-Tapon L, Chneiweiss H, Wager M, Vallette F, et al: **An ANOCEF genomic and transcriptomic microarray study of the response to radiotherapy or to alkylating first-line chemotherapy in glioblastoma patients.** *Mol Cancer* 2010, **9**:234.
18. Liang Y, Diehn M, Watson N, Bollen AW, Aldape KD, Nicholas MK, Lamborn KR, Berger MS, Botstein D, Brown PO, et al: **Gene expression profiling reveals molecularly and clinically distinct subtypes of glioblastoma multiforme.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, **102**:5814-5819.
19. Murat A, Migliavacca E, Gorila T, Lambiv WL, Shay T, Hamou MF, De TN, Regli L, Wick W, Kouwenhoven MC, et al: **Stem cell-related "self-renewal" signature and high epidermal growth factor receptor expression associated with resistance to concomitant chemoradiotherapy in glioblastoma.** *J Clin Oncol* 2008, **26**:3015-3024.
20. Tso CL, Freije WA, Day A, Chen Z, Merriman B, Perlina A, Lee Y, Dia EQ, Yoshimoto K, Mischel PS, et al: **Distinct transcription profiles of primary and secondary glioblastoma subgroups.** *Cancer Res* 2006, **66**:159-167.
21. Avril T, Vauléon E, Tanguy-Royer S, Mosser J, Quillien V: **Mechanisms of immunomodulation in human glioblastoma.** *Immunotherapy* 2011, **3**:42-44.
22. Graeber MB, Scheithauer BW, Kreutzberg GW: **Microglia in brain tumors.** *Glia* 2002, **40**:252-259.
23. Roggendorf W, Strupp S, Paulus W: **Distribution and characterization of microglia/macrophages in human brain tumors.** *Acta Neuropathol* 1996, **92**:288-293.
24. Lee Y, Scheck AC, Cloughesy TF, Lai A, Dong J, Feroqi HK, Liu LM, Horvath S, Mischel PS, Nelson SF: **Gene expression analysis of glioblastomas identifies the major molecular basis for the prognostic benefit of younger age.** *BMC Med Genomics* 2008, **1**:52.
25. Dunn J, Baborie A, Alam F, Joyce K, Moxham M, Sibson R, Crooks D, Husband D, Shenoy A, Brodbelt A, et al: **Extent of MGMT promoter methylation correlates with outcome in glioblastomas given temozolomide and radiotherapy.** *Br J Cancer* 2009, **101**:124-131.
26. Karayan-Tapon L, Quillien V, Guillhot J, Wager M, Fromont G, Saikali S, Etchevery A, Hamlat A, Loussouarn D, Campion L, et al: **Prognostic value of O6-methylguanine-DNA methyltransferase status in glioblastoma patients, assessed by five different methods.** *J Neurooncol* 2010, **97**:311-322.
27. Langfelder P, Zhang B, Horvath S: **Defining clusters from a hierarchical cluster tree: the Dynamic Tree Cut package for R.** *Bioinformatics* 2008, **24**:719-720.
28. Horvath S, Dong J: **Geometric interpretation of gene coexpression network analysis.** *PLoS Comput Biol* 2008, **4**:e1000117. doi:10.1371/journal.pcbi.1000117.
29. Cox DR: **Regression models and life-tables.** *Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological)* 1972, **34**:187-220.
30. Liu LM, Prins RM, Kiertscher SM, Odesa SK, Kremen TJ, Giovannone AJ, Liri JW, Chute DJ, Mischel PS, Cloughesy TF, et al: **Dendritic cell vaccination in glioblastoma patients induces systemic and intracranial T-cell responses modulated by the local central nervous system tumor microenvironment.** *Clin Cancer Res* 2005, **11**:5515-5525.
31. Vaquero J, Coca S, Oya S, Martinez R, Ramiro J, Salazar FG: **Presence and significance of NK cells in glioblastomas.** *J Neurosurg* 1989, **70**:728-731.
32. Sawamura Y, Abe H, Aida T, Hosokawa M, Kobayashi H: **Isolation and in vitro growth of glioma-infiltrating lymphocytes, and an analysis of their surface phenotypes.** *J Neurosurg* 1988, **69**:745-750.
33. Nagai M, Masuzawa T: **Vaccination with MCP-1 cDNA transfectant on human malignant glioma in nude mice induces migration of monocytes and NK cells to the tumor.** *Int Immunopharmacol* 2001, **1**:657-664.
34. Alizadeh D, Zhang L, Brown CE, Farrukh O, Jensen MC, Badie B: **Induction of anti-glioma natural killer cell response following multiple low-dose intracerebral CpG therapy.** *Clin Cancer Res* 2010, **16**:3399-3408.
35. Hong X, Miller C, Savant-Bhonsale S, Kalkanis SN: **Antitumor treatment using interleukin-12-secreting marrow stromal cells in an invasive glioma model.** *Neurosurgery* 2009, **64**:1139-1146.
36. Hu J, Yuan X, Belladonna ML, Ong JM, Wachsmann-Hogiu S, Farkas DL, Black KL, Yu JS: **Induction of potent antitumor immunity by intratumoral injection of interleukin 23-transduced dendritic cells.** *Cancer Res* 2006, **66**:8887-8896.
37. Vauléon E, Avril T, Collet B, Mosser J, Quillien V: **Overview of cellular immunotherapy for patients with glioblastoma.** *Clin Dev Immunol* 2010, **2010**:1-18. article ID 689171.
38. Komohara Y, Ohnishi K, Kuratsu J, Takeya M: **Possible involvement of the M2 anti-inflammatory macrophage phenotype in growth of human gliomas.** *J Pathol* 2008, **216**:15-24.
39. Ying SY, Zhang Z, Furst B, Batres Y, Huang G, Li G: **Activins and activin receptors in cell growth.** *Proc Soc Exp Biol Med* 1997, **214**:114-122.
40. Simon DP, Vadakkadath MS, Wilson AC, Gallego MJ, Weinecke SL, Bruce E, Lyons PF, Haas RJ, Bowen RL, Atwood CS: **Activin receptor signaling regulates prostatic epithelial cell adhesion and viability.** *Neoplasia* 2009, **11**:365-376.
41. Jung B, Gomez J, Chau E, Cabral J, Lee JK, Anselm A, Slowik P, Ream-Robinson D, Messer K, Sporn J, et al: **Activin signaling in microsatellite stable colon cancers is disrupted by a combination of genetic and epigenetic mechanisms.** *PLoS One* 2009, **4**:e8308.
42. Tougeron D, Fauquembergue E, Rouquette A, Le PF, Sesboue R, Laurent M, Berthet P, Maullon J, Di FF, Sabourin JC, et al: **Tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal cancers with microsatellite instability are correlated with the number and spectrum of frameshift mutations.** *Mod Pathol* 2009, **22**:1186-1195.
43. Morris SM Jr: **Recent advances in arginine metabolism: roles and regulation of the arginases.** *Br J Pharmacol* 2009, **157**:922-930.
44. Yachimovich-Cohen N, Even-Ram S, Shufaro Y, Rachmilewitz J, Reubini B: **Human embryonic stem cells suppress T cell responses via arginase I-dependent mechanism.** *J Immunol* 2010, **184**:1300-1308.

45. Tedder TF, Tuscano J, Sato S, Kehrl JH: CD22, a B lymphocyte-specific adhesion molecule that regulates antigen receptor signaling. *Annu Rev Immunol* 1997, **15**:481-504.
46. Wilson GL, Fox CH, Fauci AS, Kehrl JH: cDNA cloning of the B cell membrane protein CD22: a mediator of B-B cell interactions. *J Exp Med* 1991, **173**:137-146.
47. Mott RT, It-Ghezala G, Town T, Mori T, Vendrame M, Zeng J, Ehrhart J, Mullan M, Tan J: Neuronal expression of CD22: novel mechanism for inhibiting microglial proinflammatory cytokine production. *Glia* 2004, **46**:369-379.
48. Lolome W, Joshi AD, Ap Rhys CM, Piccirillo S, Vescovi AL, Gallia GL, Riggins GJ: Glioblastoma cell growth is suppressed by disruption of Fibroblast Growth Factor pathway signaling. *J Neurooncol* 2009, **94**:359-366.
49. Lemiére S, Azar R, Belloc F, Gursel D, Pyronnet S, Bikfalvi A, Auguste P: Overexpression of high molecular weight FGF-2 forms inhibits glioma growth by acting on cell-cycle progression and protein translation. *Exp Cell Res* 2008, **314**:3701-3711.
50. Cohen-Jonathan E, Toulas C, Monteil S, Couderc B, Maret A, Bard JJ, Prats H, Ly-Schweitzer N, Favre G: Radioresistance induced by the high molecular forms of the basic fibroblast growth factor is associated with an increased G2 delay and a hyperphosphorylation of p34CDC2 in HeLa cells. *Cancer Res* 1997, **57**:1364-1370.
51. Salmaggi A, Eoli M, Frigerio S, Silvani A, Gelati M, Corsini E, Broggi G, Bolardi A: Intracavitary VEGF, bFGF, IL-8, IL-12 levels in primary and recurrent malignant glioma. *J Neurooncol* 2003, **62**:297-303.
52. Lynch SA, Bond PM, Copp AJ, Kirwan WO, Nour S, Balling R, Mariman E, Burn J, Strachan T: A gene for autosomal dominant sacral agenesis maps to the holoprosencephaly region at 7q36. *Nature Genet* 1995, **11**:93-95.
53. Harrison KA, Druey KM, Deguchi Y, Tuscano JM, Kehrl JH: A novel human homeobox gene distantly related to proboscipedia is expressed in lymphoid and pancreatic tissues. *J Biol Chem* 1994, **269**:19968-19975.
54. Ferguson S, Gautrey HE, Strathdee G: The dual role of HLXB9 in leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 2011, **56**:349-352.
55. Filip AM, Klug J, Cayli S, Fröhlich S, Henke T, Lacher P, Eickhoff R, Bulau P, Linder M, Carlsson-Skewirt C, et al: Ribosomal protein S19 interacts with macrophage migration inhibitory factor and attenuates its pro-inflammatory function. *J Biol Chem* 2009, **284**:7977-7985.
56. Soulet F, Al ST, Roga S, Amalric F, Bouche G: Fibroblast growth factor-2 interacts with free ribosomal protein S19. *Biochem Biophys Res Commun* 2001, **289**:591-596.

doi:10.1186/1755-8794-5-41

Cite this article as: Vauléon et al: Immune genes are associated with human glioblastoma pathology and patient survival. *BMC Medical Genomics* 2012 **5**:41.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit




7. 9. Autorisation de soutenance

VU :

Le Directeur de Thèse

Pr JEAN MOSSER



VU :

Le Responsable de l'École Doctorale

VU pour autorisation de soutenance

Rennes, le

Le Président de l'Université de Rennes 1

Guy CATHELINEAU

VU après soutenance pour autorisation de publication :

Le Président de Jury,